

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAISA MORO CANTU JUNGLES

**CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIÚLCERA DE POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DA
AMEIXA SECA (*Prunus domestica*)**

CURITIBA

2013

THAISA MORO CANTU JUNGLES

**CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIÚLCERA DE POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DA
AMEIXA SECA (*Prunus domestica*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências–Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências–Bioquímica.

Orientador: Profa. Dra. Lucimara M. C. Cordeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Thales R. Cipriani

CURITIBA

2013

Orientadora: Profa. Dra. Lucimara M. C. Cordeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Thales R. Cipriani

Com muito amor:
Ao meu marido Jonathan,
Aos meus pais Ana Lucia e Jorge
Aos meus irmãos Giselle, Jorge e Letícia

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai, que me capacitou e me inspira a ser melhor a cada dia.

À minha orientadora, Prof. Dra. Lucimara Mach Côrtes Cordeiro, que me contagiou com sua dedicação à pesquisa. Por me orientar com tanta propriedade e por fazer despertar em mim o amor pela química de carboidratos. Agradeço pela confiança, paciência, estímulos, compreensão e amizade.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani, pela co-orientação, supervisão, auxílios com os experimentos e correções importantes do meu projeto.

Ao Prof. Dr. Marcello Iacomini pelo incentivo, auxílio na redação do artigo, e conversas no lab. 247.

À Prof. Dra. Maria Fernanda Werner e à Prof. Dra. Cristiane Baggio do Depto. de Farmacologia da UFPR pelo desenvolvimento dos testes de atividade antiúlcera gástrica.

Ao meu marido, Jonathan, pelo carinho, auxílio e compreensão durante estes dois anos. Pelas conquistas que alcançamos todos os dias, por se colocar ao meu lado nos momentos difíceis. É muito bom compartilhar a vida com você, te amo.

À minha mãe, Ana Lucia, pelo incentivo constante, pelas palavras de carinho e amor. Mostrou-me o caminho a ser seguido, o caráter, e me ajudou a ser quem eu sou. Minha eterna gratidão e amor.

Ao meu pai, Jorge, por acreditar em mim, e estar mais perto. Agradeço por se alegrar com minhas conquistas e dispor de seu amor e conselhos.

Aos meus irmãos queridos, Giselle, Jorge e Letícia que alegram meus dias, amo vocês.

À minha querida amiga Geógia Erdmann, pelo auxílio durante a realização de tantos experimentos, por dividir o dia a dia no laboratório, pela grande amizade e momentos de descontração.

À Andreia, pela amizade, disposição e por partilhar da sua experiência em química de carboidratos.

Aos amigos: Carolina, Juliane, Elaine, Aramis, Yanna, Ana Helena, Larry, Nessana, Camila, Arquimedes, Flávio, Lauro, Fernanda e Fhernanda pelas ajudas, pelos almoços e pela convivência agradável.

Aos alunos de iniciação científica Vanessa, Nicolas, Rafael, Nadiezda, Simone e Aline pela convivência alegre, em especial a Vanessa pelos inúmeros auxílios nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Guilherme Sasaki e ao Arquimedes pelo auxílio e disponibilidade em realizar as análises de RMN.

À Rosane e a Eliz pelas análises de GC, GC-MS e HPSEC-MALLS.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, representada pelo Prof. Dr. Miguel Nosedá e a todos os professores do Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo estímulo.

À Dona Irene, secretária do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, pelos auxílios prestados.

À todos que, de uma forma ou de outra, foram importantes para a realização desta tese e para meu amadurecimento científico, o meu muito obrigada!

À CAPES, ao PRONEX-Carboidratos, Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

As ameixas secas são os frutos desidratados de *Prunus domestica*, que podem ser diretamente consumidos, ou ainda, empregados em diversas preparações culinárias. Além disso, em muitos países, as ameixas secas são popularmente utilizadas no tratamento de distúrbios gastrointestinais. Com relação a sua composição química, carboidratos são os principais macronutrientes presentes em ameixas secas. Entretanto, a estrutura de seus polissacarídeos ainda é pouco conhecida. Este trabalho apresenta a extração, a purificação e a caracterização estrutural e a atividade antiúlcera gástrica de polissacarídeos de ameixas secas. As ameixas secas tiveram seus polissacarídeos extraídos por extração aquosa em temperatura ambiente e a quente, e extração alcalina a quente. Após diversas etapas de purificação dos polissacarídeos provenientes do extrato aquoso da ameixa, foram originadas as frações AGI-50R e AGI-50E, que apresentaram-se homogêneas quando analisados por HPSEC-MALLS, com M_w de 62 kDa e 17 kDa, respectivamente. A composição monossacarídica de AGI-50R e AGI-50E indicou a presença de Ara, Gal, Rha e GalA numa proporção molar de 47,8:31,5:10,7:10,0 e 39,6:50,3:5,1:5,0, respectivamente. Análise de metilação e espectroscopia de RMN- ^{13}C indicaram que ambos os polissacarídeos eram arabinogalactanas do tipo I (AG-I), formadas por cadeias principais compostas por unidades de β -D-Galp (1 \rightarrow 4) ligadas, substituídas em O-3, O-2 e O-6 por terminais não-redutores de α -L-Araf ou cadeias laterais de α -L-Araf (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 5), (1 \rightarrow 3,5) e (1 \rightarrow 2,5) ligadas. Estas AG-I, por sua vez, estão inseridas na posição O-4 de algumas unidades de ramnose, de uma ramnogalacturonana do tipo I (RG-I), formada pela repetição da unidade dissacarídica [\rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)]. Além da massa molecular, AGI-50E e AGI-50R diferiram quanto às proporções de RG-I e AG-I, no tamanho da cadeia de β -Galp (1 \rightarrow 4) ligada, e na proporção das cadeias laterais de arabinanas. Com relação ao extrato alcalino, após diversas etapas de purificação, foi obtida a fração PF-SPK-100R, que contém Fuc, Ara, Xyl, Gal e Glc em uma razão molar de 3,5:12,7:34,0:11,2:38,6. Análises de metilação e espectroscopia de RMN- ^{13}C indicaram que a fração contém uma xiloglucana composta por uma cadeia principal de Glcp (1 \rightarrow 4) ligada, com substituições em O-6 por unidades de xilose. Unidades de Xylp terminais, (1 \rightarrow 2), (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 2,4) ligadas foram encontradas, sendo estas duas últimas raramente encontradas em xiloglucanas. Outros açúcares pouco comuns também foram identificados na fração. Estes poderiam estar diretamente ligados à xiloglucana, ou ainda, ser oriundos de outros polissacarídeos que poderiam estar presentes em menor concentração. Por este motivo, um estudo detalhado dos oligossacarídeos produzidos por hidrólise enzimática específica, deverá ser conduzido futuramente para completa elucidação estrutural desta xiloglucana. Além da caracterização estrutural dos polissacarídeos presentes na ameixa seca, a atividade gastroprotetora dos mesmos foi avaliada. Para isto, utilizou-se o extrato aquoso bruto, que foi capaz de inibir a formação de lesão gástrica induzida por etanol em ratos, em $67 \pm 11\%$ e $60 \pm 12\%$ nas doses de 3 e 10 mg/kg, respectivamente. Portanto, este resultado mostra que polissacarídeos presentes em ameixas secas apresentam atividade protetora antiúlcera gástrica.

Palavras-chave: *Prunus domestica*. Polissacarídeos. Atividade antiúlcera.
Caracterização estrutural.

ABSTRACT

Prunes are the dried fruits of *Prunus domestica*, which can be directly consumed, or employed in various culinary preparations. Moreover, in many countries, prunes are popularly used in the treatment of gastrointestinal disorders. With respect to their chemical composition, carbohydrates are the main nutrient present in prunes. However, the structure of its polysaccharides is poorly known. This paper presents the extraction, purification and structural characterization and gastric antiulcer activity of polysaccharides from prunes. Prunes had their polysaccharides extracted by aqueous extraction at room temperature and with hot water, and alkaline extraction. After several steps of polysaccharides purification from the aqueous extract of prunes the fractions AGI-50R and AGI-50E were originated, which were homogeneous when analyzed by HPSEC-MALLS, with M_w of 62 kDa and 17 kDa, respectively. The monosaccharide composition of AGI-50R and AGI-50E indicated the presence of Ara, Gal, Rha and GalA at a molar ratio of 47,8:31,5:10,7:10,0 and 39,6:50,3: 5,1:5,0 respectively. Methylation analysis and ^{13}C -NMR spectroscopy indicated that both polysaccharides were type I arabinogalactans (AG-I) formed by main chains composed of β -D-Galp (1 \rightarrow 4)-linked units, substituted at O-3, O-2 and O-6 with non-reducing terminals of α -L-Araf or side chains of α -L-Araf (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 5), (1 \rightarrow 3,5) and (1 \rightarrow 2,5) linked. These AG-I are in turn, inserted in the O-4 position of some rhamnose units of a type I rhamnogalacturonana (RG-I) formed by repeating disaccharide units of [\rightarrow 4)- α -D-GalpA - (1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)]. Besides the molecular mass, AGI-50R and AGI-50E differ in the proportions of RG-I and AG-I, the chain size of β -Galp (1 \rightarrow 4)-linked, and the proportion of the arabinans side chains. Regarding to the alkaline extract, after various purification steps, the fraction PF-SPK-100R was obtained and contained Fuc, Ara Xyl, Glc and Gal in a molar ratio of 3,5:12,7:34,0:11,2:38,6. Methylation analysis and ^{13}C -NMR spectroscopy indicated that the fraction contains a xiloglucan with a main chain composed by Glcp (1 \rightarrow 4)-linked units with substitutions at O-6 with xylose units. Units of terminal Xylp (1 \rightarrow 2), (1 \rightarrow 4) and (1 \rightarrow 2,4)-linked were found, the latter two being rarely found in xiloglucans. Other unusual sugars in xiloglucans were also identified in the fraction. These could be directly linked to the xiloglucan, or even be from other polysaccharides that could be present in lower concentrations. For this reason, a detailed study of oligosaccharides produced by enzymatic hydrolysis must be conducted in the future for a complete structure elucidation of this xiloglucan. In addition to the structural characterization of the polysaccharides present in prunes, its gastroprotective activity was also evaluated. The crude aqueous extract was tested, and it was capable of inhibiting the formation of ethanol-induced gastric damage in rats in $67 \pm 11\%$ and $60 \pm 12\%$ at doses of 3 and 10 mg/kg, respectively. Therefore, this result shows that polysaccharides present in prunes exhibit antiulcer gastric protective activity.

Key words: *Prunus domestica*. Polysaccharides. Antiulcer activity. Structural characterization

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA TIPO I.....	23
FIGURA 2.	POLISSACARÍDEOS PÉCTICOS DA PAREDE CELULAR.....	25
FIGURA 3.	ESTRUTURAS DE OLIGOSSACARÍDEOS DE XILOGLUCANAS.....	29
FIGURA 4.	FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO AQUOSA E ALCALINA DA AMEIXA SECA (<i>Prunus domestica</i>).....	41
FIGURA 5.	PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID) DAS FRAÇÕES PWC E PWH, OBTIDAS PELO PROCESSO DE EXTRAÇÃO COM ÁGUA DA AMEIXA SECA (<i>Prunus domestica</i>).....	52
FIGURA 6.	ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DE PWC(A) E PWH(B) EM D ₂ O, A 70 °C, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM....	53
FIGURA 7.	REGIÃO DE CAMPO BAIXO DO ESPECTRO DE RMN- ¹ H DAS FRAÇÕES FRAÇÃO PWC (A) E PWH (B).....	55
FIGURA 8.	FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO AQUOSA DA AMEIXA SECA (<i>Prunus domestica</i>).....	56
FIGURA 9.	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA AMOSTRA PPF- PWH EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES (PPF-PWH1 - 4) E DOS PADRÕES ÁCIDO GLUCURÔNICO (GlcA), GLUCOSE (Glc) E ÁCIDO GALACTURÔNICO (GalA).....	57
FIGURA 10.	ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DE PPF-PWH, EM D ₂ O, A 70 °C, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.....	58
FIGURA 11.	PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES SPF-PWH E SSF- PWH, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID)....	59
FIGURA 12.	ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DE SSF-PWH(A) E SPF-PWH(B) EM D ₂ O, A	

70 °C, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.....	59
FIGURA 13. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES AGI-100E E AGI-100R, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID)....	60
FIGURA 14. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES AGI-50E E AGI-50R, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID).....	61
FIGURA 15. ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DE AGI-50E(A) E AGI-50R(B) EM D ₂ O, A 70 °C, COM DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.....	62
FIGURA 16. FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO ALCALINA DA AMEIXA SECA (<i>Prunus domestica</i>).....	66
FIGURA 17. ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DE SPK EM D ₂ O, A 70 °C, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.....	67
FIGURA 18. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO SPK, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID).....	68
FIGURA 19. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES SF-SPK E PF-SPK, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID).....	69
FIGURA 20. ESPECTROS DE RMN- ¹³ C DE SF-SPK (A) E PF-SPK (B) EM D ₂ O, A 70 °C, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.....	70
FIGURA 21. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID) DAS FRAÇÕES PF-SPK-100E E PF-SPK-100R.....	71
FIGURA 22. FRAGMENTAÇÃO DA MISTURA DOS ACETATOS DE 2,3- E 3,4-Me ₂ -XILITOIS DEUTARADOS NO C-1.....	73
FIGURA 23. ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DE PF-SPK-100R EM D ₂ O, A 70 °C, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.....	74
FIGURA 24. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PWH (3, 10 E 30 mg/kg) CONTRA LESÕES GÁSTRICAS AGUDAS.....	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	CONTEÚDO DE VITAMINAS E MINERAIS EM AMEIXAS SECAS.....	21
TABELA 2.	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DAS EXTRAÇÕES AQUOSAS DA AMEIXA SECA (<i>Prunus domestica</i>).....	52
TABELA 3.	TIPOS DE LIGAÇÃO BASEADOS NA ANÁLISE DE ACETATO DE ALDITÓIS PARCIALMENTE O-METILADOS, OBTIDO DAS FRAÇÕES METILADAS AGI-50E E AGI-50R PROVENIENTES DA AMEIXA SECA (<i>Prunus domestica</i>).....	64
TABELA 4.	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DA EXTRAÇÃO ALCALINA DA AMEIXA SECA (<i>Prunus domestica</i>).....	67
TABELA 5.	TIPOS DE LIGAÇÃO BASEADOS NA ANÁLISE DE ACETATO DE ALDITÓIS PARCIALMENTE O-METILADOS, OBTIDO DA FRAÇÃO METILADA PF-SPK-100R PROVENIENTES DA AMEIXA SECA (<i>Prunus domestica</i>).....	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

δ	- Deslocamento químico
AG-I	- Arabinogalactana do tipo I
AG-II	- Arabinogalactana do tipo II
Ara	- Arabinose
CH ₃ I	- Iodeto de metila
D ₂ O	- Água deuterada
DA	- Grau de acetilação
DE	- Grau de esterificação
DMSO- <i>d</i> ₆	- Dimetilsulfóxido deuterado
Gal	- Galactose
GalA	- Ácido galacturônico
GC-MS	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
Glc	- Glucose
GlcA	- Ácido Glucurônico
GLC	- Cromatografia líquida – gasosa
HG	- Homogalacturonana
HPSEC	- Cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência
Man	- Manose
NaBD ₄	- Boroidreto de sódio deuterado
NaBH ₄	- Boroidreto de sódio
RG	- Ramnogalacturonana
RG-I	- Ramnogalacturonana do tipo I
RG-II	- Ramnogalacturonana do tipo II
Rha	- Ramnose
RMN- ¹³ C	- Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TFA	- Ácido trifluoroacético
Xyl	- Xilose

FRAÇÕES

AGI-50E	- Fração eluída na ultrafiltração em membrana de 50 kDa do sobrenadante de Fehling do extrato aquoso quente
AGI-50R	- Fração retida na ultrafiltração em membrana de 50 kDa do sobrenadante de Fehling do extrato aquoso quente
AGI-100E	- Fração eluída na ultrafiltração em membrana de 100 kDa do sobrenadante de Fehling do extrato aquoso quente
AGI-100R	- Fração retida na ultrafiltração em membrana de 100 kDa do sobrenadante de Fehling do extrato aquoso quente
PF-PWH	- Fração precipitado de Fehling, após extração aquosa à quente
PF-SPK	- Fração precipitado de Fehling, após extração alcalina à quente com KOH a 10%
PF-SPK-100E	- Fração eluída na ultrafiltração em membrana de 100 kDa do precipitado de Fehling do extrato alcalino
PF-SPK-100R	- Fração retida na ultrafiltração em membrana de 100 kDa do precipitado de Fehling do extrato alcalino
PK	- Fração precipitada do congelamento e degelo, após extração alcalina à quente com KOH a 10%
PPF-PWH	- Fração precipitada após diálise e centrifugação do precipitado de Fehling da fração PWH
PPK	- Fração precipitada do congelamento e degelo, após extração alcalina à quente com KOH a 10%
PSF-PWH	- Fração precipitada após diálise e centrifugação do sobrenadante de Fehling da fração PWH
PWC	- Fração extraída com água fria da ameixa seca
PWH	- Fração extraída com água quente em ebulição da ameixa seca
SF-PWH	- Fração sobrenadante de Fehling, após extração aquosa à quente
SF-SPK	- Fração sobrenadante de Fehling, após extração alcalina à quente com KOH a 10%

- SPF-PWH - Fração sobrenadante após diálise e centrifugação do precipitado de Fehling da fração PWH
- SPK - Fração sobrenadante do congelamento e degelo, após extração alcalina à quente com KOH a 10%
- SSF-PWH - Fração sobrenadantea pós diálise e centrifugação do sobrenadante de Fehling da fração PWH

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 TAXONOMIA	20
3.2 PROCESSAMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA AMEIXA SECA (<i>Prunus domestica</i>).....	20
3.3 POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR VEGETAL.....	22
3.3.1 Polissacarídeos pécticos	24
3.3.2 Hemiceluloses.....	27
3.3.3 Polissacarídeos de frutas.....	30
3.3.3.1 Polissacarídeos do gênero <i>Prunus</i>	35
3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA AMEIXA SECA (<i>Prunus domestica</i>)	36
3.5 FISIOLOGIA DO TRATO GASTROINTESTINAL E ÚLCERA GÁSTRICA.....	37
3.4.2 Atividade antiúlcera de polissacarídeos	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 MATERIAL DE ESTUDO	40
4.2. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	40
4.3. PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	42
4.3.1. Fracionamento dos polissacarídeos por congelamento e descongelamento.....	42
4.3.2. Fracionamento dos polissacarídeos pelo método de Fehling	42
4.3.3. Fracionamento dos polissacarídeos por ultrafiltração	43
4.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS	43
4.4.1 Composição monossacarídica	43

4.4.2 Determinação de homogeneidade e massa molar (M_w).....	44
4.4.3 Metilação dos polissacarídeos e análise na forma de acetatos de alditóis.....	44
4.4.4. Carboxirredução	46
4.4.5 Métodos analíticos.....	46
4.4.5.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)	46
4.4.5.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	47
4.4.5.3 Dosagem de ácidos urônicos	47
4.4.5.4 Cromatografia em camada delgada	47
4.4.5.5 Determinação do grau de <i>O</i> -metil esterificação por RMN - ^1H	48
4.4.5.6. Determinação do grau de <i>O</i> -acetil esterificação por espectrofotometria	48
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIÚLCERA DOS POLISSACARÍDEOS.....	49
4.5.1 Animais.....	49
4.5.2 Indução de lesão gástrica aguda em ratos.....	50
4.5.3 Análise estatística	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 EXTRAÇÃO AQUOSA E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA AMEIXA SECA.....	51
5.2 EXTRAÇÃO ALCALINA E PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS	65
6 CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

As ameixas secas são os frutos desidratados de *Prunus domestica*, espécie originária das regiões do Cáucaso, na fronteira com o Mar Cáspio (GROH *et al.*, 1994). Esta espécie pertence ao gênero *Prunus* (família Rosaceae), que compreende outras plantas que também produzem frutos comestíveis como pêssago (*P. persica*), cerejas (*P. cerasus* e *P. avium*) e damasco (*P. insitia*) (STEPHEN, 1983).

Embora o uso principal de ameixas secas seja para consumo direto do produto embalado, existem várias outras aplicações na culinária e indústria, como na produção de suco de ameixa, purê, misturas com cereais ou até mesmo carne moída e no desenvolvimento de artefatos que substituem gordura em preparações culinárias (STACEWICZ-SAPUNTZAKIS *et al.*, 2011).

Popularmente, as ameixas secas são utilizadas também como um tratamento para distúrbios gastrointestinais, como constipação e diarreia (STACEWICZ-SAPUNTZAKIS *et al.*, 2011). Além disso, evidências científicas com base em estudos clínicos indicam que o consumo de ameixas secas pode ser útil no tratamento de hepatite (AHMED, SADIA, KHALID, *et al.*, 2010), hipertensão (AHMED, SADIA, BATOOL, *et al.*, 2010) e osteoporose (HOOSHMAND e ARJMANDI, 2009). Foi demonstrado ainda que as fibras de ameixas secas são capazes de reduzir lipídeos do plasma e fígado (TINKER *et al.*, 1994) e são provavelmente o componente mais importante responsável pela saciedade promovida pelo seu consumo (FARAJIAN *et al.*, 2010).

Carboidratos são os principais macronutrientes em ameixas secas e abrangem 62,7% do seu peso total (GEBHARDT *et al.*, 1982). Aspectos estruturais de polissacarídeos, como composição monossacarídica, grau de ramificação e tipos de ligações glicosídicas, estão diretamente relacionados às suas propriedades terapêuticas. Assim sendo, o conhecimento da estrutura química é relevante no estudo das funções biológicas e, portanto, justifica-se a elucidação da estrutura dos polissacarídeos presentes na ameixa seca, assim como avaliação da sua atividade gastroprotetora.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar estruturalmente os polissacarídeos presentes na ameixa seca (*Prunus domestica*) e verificar se eles apresentam atividade antiúlcera gástrica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo geral acima descrito, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- Extrair os polissacarídeos da polpa da ameixa seca por extração aquosa a temperatura ambiente e à quente, bem como por extração alcalina à quente;
- Purificar os polissacarídeos extraídos;
- Caracterizar estruturalmente os polissacarídeos obtidos;
- Avaliar a atividade antiúlcera dos polissacarídeos do extrato bruto, proveniente da extração aquosa a quente da ameixa seca, em ratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 TAXONOMIA

A ameixeira, de nome científico *Prunus domestica*, pertence à classe das dicotiledôneas (*Magnoliopsida*), família *Rosaceae*. Fazem parte do gênero *Prunus* outras árvores frutíferas conhecidas, tais como o pessegueiro (*Prunus persica*), o damasqueiro (*Prunus insitia*), a cerejeira (*Prunus cerasus* e *Prunus virginiana*) e a amendoeira (*Prunus amygdalus*) (STEPHEN, 1983). *Prunus domestica* constitui o grupo mais numeroso e diverso, em termos de variedade, entre as árvores frutíferas. Somente no mercado Europeu existem cerca de 1300 variedades diferentes disponíveis para o cultivo (BLAŽEK, 2007).

A variedade mais comumente usada para produção de ameixa-seca é a franco-californiana, também conhecida por d'Agen. Mesmo sendo originária da França, hoje é extensivamente cultivada nos Estados Unidos (PEREZ e POLLACK, 2012). Esta variedade possui uma polpa firme, e um alto teor de açúcar e acidez, o que permite que as frutas sejam secas com seus caroços intactos, sem que ocorra fermentação.

3.2 PROCESSAMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA AMEIXA SECA (*Prunus domestica*)

Para se produzir ameixas-secas, os frutos são deixados no pé até que amadureçam completamente. Após a colheita, as ameixas são desidratadas em ar quente a 85-90 °C por 18 horas. Desta forma, a umidade passa de 75% para 21% e o produto pode então ser armazenado em temperatura ambiente por pelo menos 12 meses. Entretanto, após tal processo, as ameixas estão muito duras para serem consumidas diretamente. Por este motivo, as ameixas secas são reidratadas em banho quente a 77 °C para que atinjam aproximadamente 32% de umidade. O ácido sórbico é então adicionado durante o processo de envase para garantir a estabilidade

microbiológica do produto (STACEWICZ-SAPUNTZAKIS *et al.*, 2011). O teor reduzido de umidade após processamento implica em aumento do conteúdo de carboidratos, proteínas e lipídeos, se comparado ao peso do produto não processado (MOUTOUNET, 1976).

Quanto a sua composição de macronutrientes, as ameixas secas contêm aproximadamente 62,7% de carboidratos, um baixo teor de lipídeos (0,5%) e cerca de 2,6% de proteína (GEBHARDT *et al.*, 1982). Com relação aos micronutrientes, a Tabela 1 sumariza as principais vitaminas e minerais encontrados em ameixas secas (STACEWICZ-SAPUNTZAKIS *et al.*, 2011). Dentre os micronutrientes presentes, destacam-se o alto conteúdo de potássio (745 mg/100 g), que atende 21% da recomendação de ingestão diária e de boro, que atende 100% da ingestão diária recomendada (2-3 mg/100 g) (FDA, 1993; GEBHARDT *et al.*, 1982).

TABELA 1. CONTEÚDO DE VITAMINAS E MINERAIS EM AMEIXAS SECAS

Conteúdo por 100 g			
Minerais		Vitaminas	
Cálcio	51 mg	Vitamina C	3,3 mg
Ferro	2,5 mg	Tiamina	0,08 mg
Magnésio	45 mg	Riboflavina	0,16 mg
Fósforo	79 mg	Niacina	2 mg
Potássio	745 mg	Ácido Pantotênico	0,46 mg
Sódio	4 mg	Piridoxina	0,28 mg
Zinco	0,5 mg	Folato	3,7 µg
Cobre	0,4 mg	Vitamina A	259 UI
Manganês	0,2 mg	Vitamina E	2,6 UI
Boro	2,2 mg		

Adaptado de STACEWICZ-SAPUNTZAKIS *et al.* (2011).

Estudos relatam ainda a presença de grandes quantidades de compostos fenólicos (184 mg/100 g), principalmente ácidos clorogênico e neoclorogênico, e

carotenóides como luteína, α - e β -caroteno que representam 291 μg em 100 g de ameixa seca (REED-MANGELS *et al.*, 1993).

3.3 POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR VEGETAL

Conforme citado anteriormente, ameixas secas são constituídas majoritariamente por carboidratos. Os polissacarídeos que compõe a parede celular vegetal, possuem importante papel na sua forma celular, textura do tecido e morfologia final (REID, 1997). A proteção das células contra o ataque de patógenos (BRETT e WALDRON, 1990), ativação de genes responsáveis pela síntese de fitocompostos e comunicação intercelular (BRETT e WALDRON, 1990) também são funções atribuídas aos polissacarídeos.

Várias camadas com diferentes estruturas formam a parede celular. Nos vegetais superiores distinguem-se três camadas: lamela média, parede celular primária e parede celular secundária (COIMBRA *et al.*, 2004). Quando uma célula cresce, as ligações entre os polissacarídeos da parede são rompidas, a célula se expande e novos polissacarídeos são sintetizados e inseridos entre os já existentes. Este processo envolve o rompimento e a formação de numerosas ligações covalentes e não covalentes. Desse modo, as células podem aumentar muitas vezes seu comprimento sem ocasionar enfraquecimento da parede celular (CARPITA e MCCANN, 2000; RAVEN *et al.*, 2001).

A lamela média é a primeira camada a ser formada durante a divisão da célula. É constituída por uma camada intercelular amorfa de pequena espessura rica em pectinas, que une as paredes primárias de células vizinhas (RAVEN *et al.*, 2001). A parede primária forma-se após a lamela média e é constituída essencialmente por microfibrilas de celulose envolvidas por uma matriz de polissacarídeos hemicelulósicos e pécticos, apresentando importância na expansão celular (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

Em dicotiledôneas, grupo onde está inserida a espécie em estudo (*P. domestica*), a parede celular primária é do tipo I (Figura 1) e apresenta em sua

composição aproximadamente 25-40% de celulose, 15-25% de hemiceluloses, 15-40% de polissacarídeos pécnicos, 5-10% de proteínas e traços de compostos fenólicos (AVIGAD e DEY, 1997).

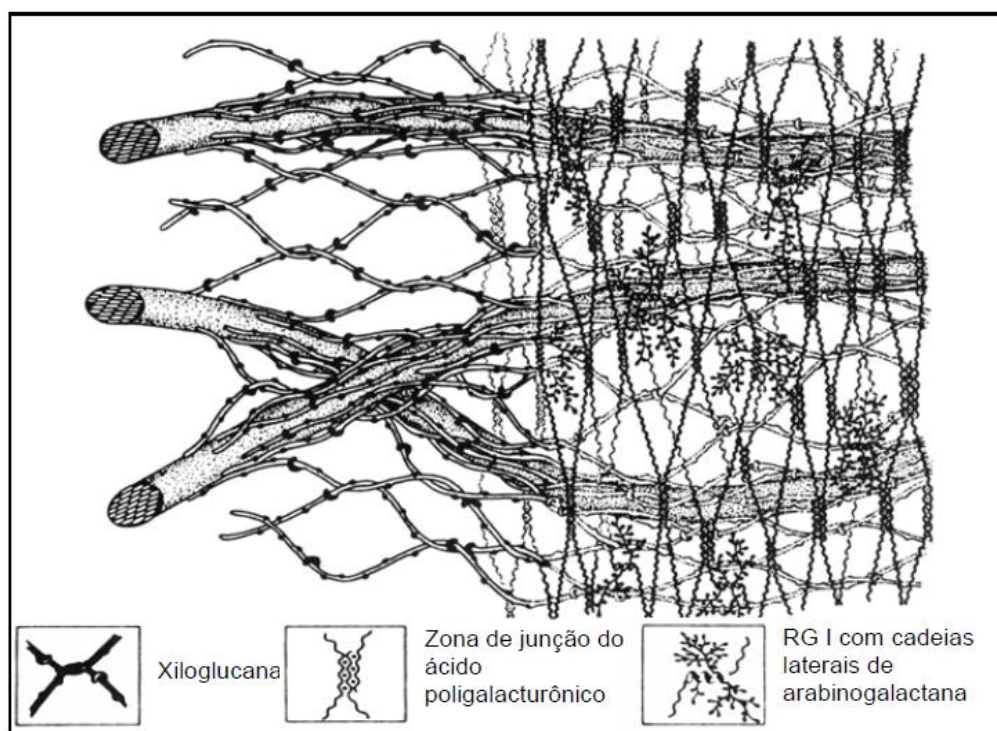


FIGURA 1. MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA TIPO I
FONTE: Carpita e Gibeaut (1993)

A parede celular secundária forma-se após cessar a divisão celular, internamente à parede celular primária e pode tornar-se bastante espessa devido à deposição de celulose, hemicelulose e lignina, resultando na diferenciação terminal da célula por conferir resistência à compressão e rigidez à parede. A constituição química deste tipo de parede, em dicotiledôneas, passa a ser de 40-45% de celulose, 15-35% de hemicelulose, 15-30% de lignina e traços de pectina (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

No caso específico dos polissacarídeos da ameixa, sabe-se que depois da celulose, ela é constituída majoritariamente por polissacarídeos pécnicos e pequenas quantidades de hemiceluloses (NUNES *et al.*, 2008). Por este motivo, a estrutura detalhada de pectinas e hemiceluloses foi abordada a seguir.

3.3.1 Polissacarídeos pécticos

Os polissacarídeos pécticos somam cerca de um terço da matéria seca da parede celular das dicotiledôneas, como é o caso da ameixa, e formam o grupo mais complexo de compostos constituintes da parede celular primária e da lamela média. As pectinas diferem nas suas propriedades físicas, nutricionais e funcionais e sofrem alterações durante o processo de crescimento e amadurecimento dos frutos (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Polissacarídeos da lamela média das paredes celulares vegetais são importantes para a adesão célula-célula, enquanto que pectinas presentes na parede celular primária contribuem para a retenção de água e formação de géis, que influenciam as propriedades mecânicas da parede celular (CARPITA e MCCANN, 2000). O gel formado por cadeias de pectina é constituído por cadeias lineares de ácido poligalacturônico. Estas cadeias podem estabelecer ligações cruzadas com íons cálcio, dando origem às “zonas de junção” entre cadeias anti-paralelas (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

Existem quatro tipos de polissacarídeos pécticos identificados, tendo em comum o seu esqueleto formado por unidades de ácido galacturônico (Figura 2): homogalacturonanas (HG), xilogalacturonanas (XG), ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) e ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II) (WILLATS *et al.*, 2006).

As homogalacturonanas constituem a região lisa das pectinas, também conhecida como “*smooth region*” e são formadas por cadeias lineares de ácidos D-galacturônicos unidos por ligações glicosídicas do tipo α -(1 \rightarrow 4), que podem estar parcialmente metil-esterificados em C-6 e O-acetilados em C-2 e/ou C-3. Algumas unidades de ácido galacturônico podem aparecer substituídos em O-3 por unidades de xilose, formando as xilogalacturonanas (RIDLEY *et al.*, 2001). A proporção de grupos carboxílicos metil-esterificados nas pectinas é expressa como grau de metil-esterificação (DE). Dependendo do grau de DE, as pectinas são divididas em dois grupos: pectinas com alto teor de metil-esterificação (HM) que possuem DE superior a 50%, e pectinas com baixo teor de esterificação (LM), que possuem DE inferior a 50% (VORAGEN *et al.*, 1995). O teor de metil-esterificação em conjunto com o número e a distribuição de unidades de ramnose entre as unidades de GalA dependem da fonte da

pectina e têm grande influência na solubilidade e na propriedade do polímero em formar gel (BE MILLER, 1993).

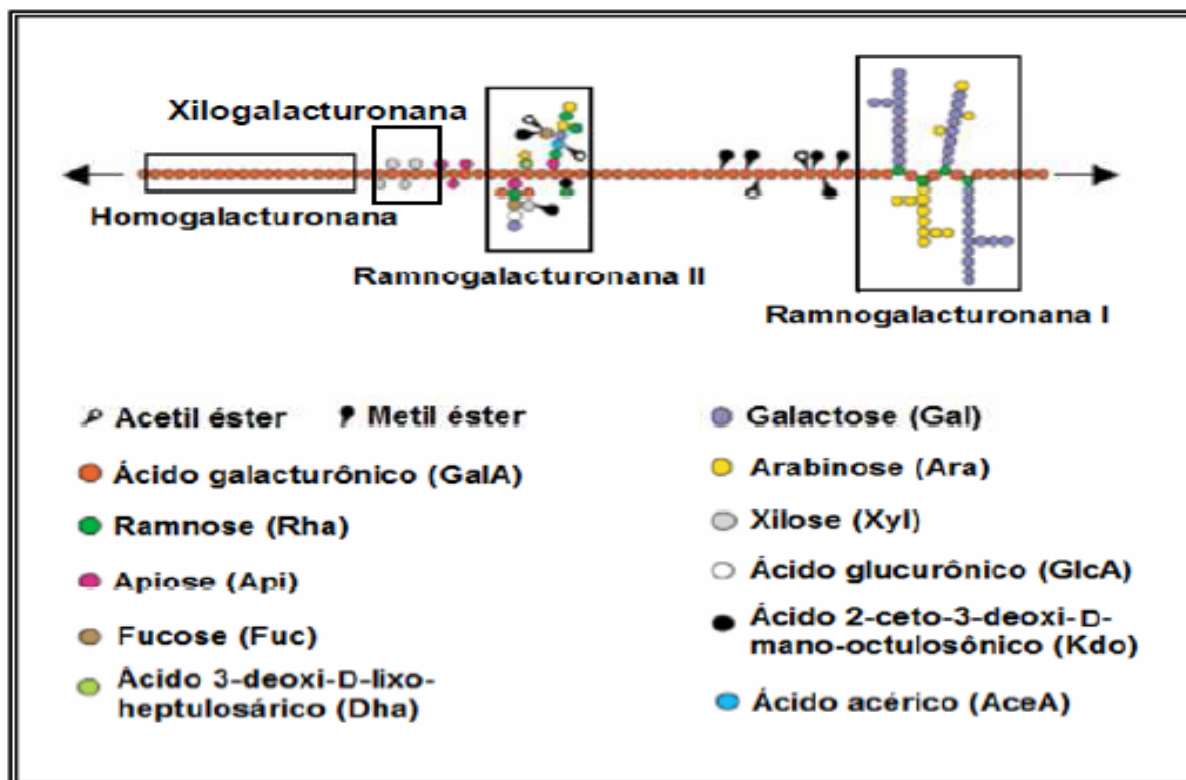


FIGURA 2. POLISSACARÍDEOS PÉCTICOS DA PAREDE CELULAR.

FONTE: adaptado de Willats *et al.*(2006).

Ramnogalacturonanas são divididas em dois tipos: ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) e ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II). As RG-I são formadas por uma cadeia principal de unidades alternantes de ácido α -D-galacturônico ligado (1 \rightarrow 4), e α -L-ramnose ligada (1 \rightarrow 2), à qual se ligam cadeias laterais de polissacarídeos neutros, tais como arabinanas, galactanas e arabinogalactanas (DE VRIES, 1988; SCHOLS e VORAGEN, 1996). Outros açúcares que podem estar ligados nas cadeias laterais são: D-xilose, D-glucose, D-manose, L-fucose e ácido D-glucurônico (VORAGEN *et al.*, 1995).

As arabinogalactanas ocorrem em duas formas clássicas que estruturalmente são diferenciadas principalmente com relação ao tipo de ligação da cadeia principal.

Arabinogalactanas do tipo I (AG-I) são constituídas por uma cadeia principal de β -D-galactopiranoses ligadas (1 \rightarrow 4), substituídas por unidades de arabinose e galactose (STEPHEN, 1983). Entretanto, variações estruturais podem ocorrer, como verificado por Hinz e colaboradores (2005), que identificaram a presença de elementos estruturais de β -D-galactopiranoses ligadas (1 \rightarrow 3) em arabinogalactanas do tipo I presentes na soja, laranja lima, batata e cebola, em diferentes proporções. Segundo Carpita e Gibeaut (1993), as cadeias laterais presentes na AG-I são geralmente ligadas ao O-3 da cadeia principal de β -D-galactose e o conteúdo de arabinose que esta classe de arabinogalactanas pode apresentar é muito variável, podendo chegar a 50%. Além disso, em algumas espécies, unidades de β -D-galactose podem estar ramificadas em O-6 e em O-2 como encontrado na polpa do kiwi, *Cistanche deserticola*, *Basella rubra* e *Cereus peruvians* (DONG *et al.*, 2012; REDGWELL *et al.*, 1988; TANAKA *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2005). As unidades de arabinose das ramificações da AG-I podem ser terminais ou ligadas em O-3, O-5 e O-3,5 (CIPRIANI *et al.*, 2009; DONG *et al.*, 2007; HABIBI *et al.*, 2004; IACOMINI *et al.*, 2005; NERGARD *et al.*, 2005) e mais raramente em O-2 e O-2,5 (CIPRIANI *et al.*, 2009; TISCHER, IACOMINI, *et al.*, 2002).

Por outro lado, arabinogalactanas do tipo II (AG-II) são majoritariamente pequenas e constituídas por uma cadeia principal formada por unidades de β -D-Galp (1 \rightarrow 3) ligadas ou ainda β -D-Galp (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) ligadas (ASPINALL, 1969; FINCHER *et al.*, 1983; MCNEIL *et al.*, 1984; STEPHEN, 1983). As cadeias laterais podem estar inseridas nas posições O-3 e O-6 das unidades de β -D-Galp que formam a cadeia principal (DONG e FANG, 2001; KANG *et al.*, 2011; SAULNIER *et al.*, 1988; WANG *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2005). As ramificações incluem cadeias laterais constituídas por α -L-Araf terminal, (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 5) ligada. Além disso, ramificações podem conter unidades de D-GlcpA e 4-O-metil-D-GlcpA (ASPINALL, 1969; FINCHER *et al.*, 1983; MCNEIL *et al.*, 1984; STEPHEN, 1983; THUDE e CLASSEN, 2005).

Ramnogalacturonanas do tipo II são polissacarídeos pécticos bastante complexos, de baixo peso molecular, contendo na sua cadeia principal 7 a 10 unidades de GalpA com ligação α -(1 \rightarrow 4), substituídos em O-2 e/ou O-3 por cadeias laterais

heteropoliméricas. Estas cadeias laterais das RG-II contêm cerca de 12 açúcares diferentes e 20 ligações distintas. Os açúcares mais comuns são L-Rha, L-Ara, D-Gal e D-GlcA. Outros açúcares incomuns como, por exemplo, apiose, ácido acérico e os açúcares metilados 2-*O*-metil-L-Fucp e 2-*O*-metil-D-Xylp, também podem ser encontrados nas RG-II. Estes polissacarídeos ocorrem em pequenas percentagens nas células do parênquima, mas têm uma função importante na estrutura das paredes celulares (VINCKEN *et al.*, 2003).

3.3.2 Hemiceluloses

Por ser um grupo heterogêneo de estruturas, ainda não há um consenso para definição de hemiceluloses. Alguns autores atribuem o termo aos polissacarídeos de baixa massa molar encontrados na parede celular de plantas terrestres, que se associam com a celulose e a lignina (COLLINS e FERRIER, 1995). Segundo Aspinal (1969) e Timell (1964), o termo hemicelulose refere-se aos polissacarídeos presentes em tecidos vegetais que ocorrem juntamente com a celulose e que podem ser isolados por extrações aquosas ou, com maior frequência, alcalinas.

A função principal das hemiceluloses em tecidos vegetais é unir microfibrilas de celulose, fortalecendo assim a parede celular (COSGROVE, 2005). Como característica comum, todos os polissacarídeos hemicelulósicos possuem uma cadeia principal formada por açúcares β -ligados. Em xilanas e mananas, por exemplo, as cadeias principais são de β -(1 \rightarrow 4)-D-Xyl e β -(1 \rightarrow 4)-D-Man, respectivamente, enquanto que glucomananas possuem cadeia principal constituída por unidades alternadas de β -(1 \rightarrow 4)-Glc e β -(1 \rightarrow 4)-Man. Estes polímeros podem estar ligados a uma variedade de cadeias laterais, assim como a grupos acetil (HARRIS e STONE, 2008).

Os principais polissacarídeos hemicelulósicos encontrados em dicotiledôneas são xiloglucanas. Xiloglucanas possuem estrutura formada por uma cadeia principal composta por unidades de β -D-glucopiranoses (1 \rightarrow 4) ligadas substituídas em O-6 por unidades de α -D-xilopiranoses, as quais por sua vez, podem estar substituídas em O-2 por unidades de D-Galp (BUCKERIDGE, 2010). Outros açúcares podem estar ligados

às unidades de α -D-xilopiranosose e, além disso, muitas xiloglucanas podem estar *O*-acetiladas nas unidades de β -D-Galp (GILLE *et al.*, 2011; HSIEH e HARRIS, 2009; KIEFER *et al.*, 1989). York e colaboradores (1988) determinaram a localização de substituintes *O*-acetil em xiloglucanas isoladas de sicômoro e encontraram que estes ocorrem principalmente nas unidades de galactose (1→2) ligadas, as quais podem ser mono-*O*-acetiladas em O-6 e di-*O*-acetiladas em O-4 e O-3.

Xiloglucanas de dicotiledôneas normalmente contém L-fucose, além de D-glucose, D-xilose, e D-galactose. A fucose é ligada na posição O-2 das unidades de galactose. Unidades de arabinose também podem estar presentes em pequenas quantidades. Em solanáceas, por exemplo, arabinose foi encontrada como terminal não redutor ligada em O-2 das unidades de xilose (HAYASHI, 1989).

A estrutura química detalhada de muitas xiloglucanas tem sido estudada com base em oligossacarídeos resultantes de hidrólise enzimática com celulase [endo- β -(1→4)-glucanase] e, mais recentemente, com endo- β -(1→4)-glucanases xiloglucana-específicas (HILZ *et al.*, 2007; HOFFMAN *et al.*, 2005; PEÑA *et al.*, 2008). Códigos formados por uma única letra são usados para distinguir cadeias laterais diferentes em xiloglucanas (FRY *et al.*, 1993). As letras G, X, S, L e F referem-se às estruturas comumente encontradas em xiloglucanas de angiospermas, conforme apresentado na Figura 3.

A maioria das xiloglucanas de angiospermas examinadas até o momento tem uma estrutura principal repetitiva de XXXG, com cadeias laterais de L e F, rendendo os seguintes oligossacarídeos: XXXG, XXFG e XLFG, que são normalmente os mais abundantes juntamente com XXLG, XLXG e XLLG (HSIEH e HARRIS, 2009).

3.3.3 Polissacarídeos de frutas

Carboidratos e compostos glicosilados possuem papel importante na determinação de características específicas das frutas como cor, textura e sabor (LADANIYA, 2008). O balanço entre açúcares e ácidos é um fator importante na determinação do sabor dos frutos, assim como alguns glicoconjugados, que favorecem a coloração específica de certas variedades. Os polissacarídeos também vêm sendo amplamente investigados quanto a sua interferência na textura dos frutos, a qual apresenta variações de acordo com seu estágio de desenvolvimento (LADANIYA, 2008). Durante o amadurecimento muitos frutos apresentam uma perda de firmeza substancial. As alterações texturais que levam ao amolecimento de frutos neste processo são normalmente acompanhados por perda de açúcares neutros, solubilização e despolimerização dos polissacarídeos da parede celular e rearranjos de suas associações, como resultado da ação combinada de diversas enzimas que modificam a parede celular, agindo nas frações pécticas e hemicelulósicas (GOULAO e OLIVEIRA, 2008).

Estudos recentes sobre o metabolismo de parede celular durante o amadurecimento têm mostrado que este é um processo ordenado, envolvendo nos estágios iniciais, relaxamento da parede celular e degradação de hemicelulose seguida, nos estádios finais, pela despolimerização da pectina. Além disso, um limitado número de estudos tem indicado que espécies que geram radicais de oxigênio por meios enzimáticos ou não enzimáticos podem participar da excisão de pectinas e outros polissacarídeos durante o amadurecimento e outros processos de desenvolvimento (DUAN *et al.*, 2011; HUBER *et al.*, 2001). Mecanismos similares podem também ocorrer em resposta a ferimentos, um evento tipicamente seguido por um incremento em vias oxidativas. Em muitas frutas, a alteração em polissacarídeos mais estudada está relacionada à um aumento em enzimas pectinolíticas, acompanhada da perda de polímeros de ácido urônico, que tem sido associada ao processo de amolecimento (HUBER *et al.*, 2001). Além da pectina, uma perda de açúcares neutros também ocorre durante o amadurecimento de diversas frutas, como peras, maçãs, morangos e tomates. Em estudo que analisou a composição de açúcares neutros de diversas frutas

durante amadurecimento, a redução destes foi encontrada em 15 dos 17 tipos de frutas analisados. Em 14 delas, uma maior perda ocorreu nos teores arabinose e/ou galactose. No caso do damasco, a xilose foi o principal monossacarídeo perdido durante o amadurecimento. Em ameixas e abóboras, entretanto, não foi verificada a perda de açúcares neutros durante amadurecimento (GROSS e SAMS, 1984).

De maneira geral, pectinas constituem cerca de 40% da parede celular de frutas e vegetais, e são os polissacarídeos mais estudados em frutas (BRETT e WALDRON, 1990). De fato, a identificação da primeira substância péctica ocorreu no fruto do tamarindo no século XVIII, que, na época, foi descrita como uma “substância peculiar” e somente após o século XIX, ao identificar suas propriedades geleificantes, foi nomeada como pectina (LADANIYA, 2008). As fontes mais ricas de pectinas são os frutos cítricos, podendo ser extraídas em abundância principalmente do tecido albedo, região mesocárpica do fruto. Outra fonte natural deste carboidrato é a maçã, que conjuntamente com os frutos cítricos constituem as principais matérias primas para produção de pectinas para uso comercial (MC CREADY, 1970; WILLATS *et al.*, 2006).

A maior parte das pectinas é passível de extração aquosa. Entretanto, extrações sequenciais usando além da água, soluções de oxalato ou EDTA e soluções de HCl e NaOH também têm sido empregadas em vários estudos para isolar pectinas da parede celular de frutos (KOŠŤÁLOVÁ *et al.*, 2012; RAMÍREZ-TRUQUE *et al.*, 2011; RENARD e THIBAUT, 1993). O processo de extração em meio alcalino rende pectinas de baixo grau de metoxilação, como resultado da saponificação dos grupos éster; bem como redução no comprimento da cadeia de ácido poli-galacturônico por β -eliminação (JOYE e LUZIO, 2000). Por outro lado, a extração ácida oferece maiores rendimentos (até 20%) de pectinas de alto grau de metoxilação (LEVIGNE *et al.*, 2002), simulando o que ocorre naturalmente nos frutos. Esta situação é preferível e mais usada pelo fato de não promover mudanças abruptas na estrutura fina do polissacarídeo, permitindo uma caracterização mais confiável do ponto de vista físico e químico (JOYE e LUZIO, 2000). Ressalta-se, entretanto, que a redução extrema de pH pode ser desfavorável, visto que gerar degradação no polímero e a desesterificação da pectina (CHO e HWANG, 2000; YAPO *et al.*, 2007).

A estrutura química das pectinas pode ser extremamente heterogênea entre as espécies, tecidos e até mesmo entre as diferentes partes do fruto (MC CREADY, 1970; WILLATS *et al.*, 2006). O conteúdo de ácidos urônicos em pectinas, por exemplo, foi de 65% na polpa de cupuaçu (VRIESMANN e PETKOWICZ, 2009), 32,3% na pitaya (RAMÍREZ-TRUQUE *et al.*, 2011), 40-70% na manga (KRATCHANOVA *et al.*, 1991), 53,5% na bael (*Aegle marmelos*) (BASAK *et al.*, 1981) e 78% na laranja (PRABASARI *et al.*, 2011). Entretanto, conforme citado anteriormente, é importante ressaltar que o conteúdo de ácidos urônicos pode variar conforme o tipo de extração realizada. Silva e colaboradores (2012) realizaram extração aquosa a quente do maracujá e encontraram menor proporção de ácidos urônicos (44,2%) do que aquela encontrada por Yapo e Koffi (2006) ao realizar extração com solução de ácido nítrico (75,2%).

Em homogalacturonanas de frutas o grau de metilação (DM) e acetilação (DA) também é variável. Um alto DM e baixo DA foi encontrado nas polpas de cupuaçu (DM 53%; DA 1,7%) (VRIESMANN e PETKOWICZ, 2009) e *Chaenomeles japonica* (DM 59-80%; DA 0-9%) (THOMAS e THIBAUT, 2002; VRIESMANN e PETKOWICZ, 2009). Em mirtilos, o DM na polpa e na pele foi de 65-77%, e o grau acetilação bastante elevado chegando a aproximadamente 100%. Entretanto, embora seja possível a ligação de dois grupos acetil em um único resíduo de ácido urônico, é mais provável que estes grupos acetil não estejam ligados somente ao ácido urônico, mas também a polissacarídeos hemicelulósicos (HILZ *et al.*, 2005).

Em diversas frutas como cacau, mamão, banana da terra, abacate, caju, limão e laranja lima, a maior parte de unidades de ácido galacturônico de pectinas, é normalmente encontrada nas regiões de homogalacturonanas, sugerindo predominância de regiões de HG sobre aquela de RG-I (VRIESMANN *et al.*, 2011; YAPO, 2011b). Na uva, por exemplo, homogalacturonanas correspondem a 80% dos polissacarídeos pécticos enquanto que RG-I são responsáveis por 15% (VIDAL *et al.*, 2001). No limão, o conteúdo de GalA compreende 98% dos açúcares totais (GalA+Rha), indicando também predominância da porção de HG sobre RG-I. Da mesma forma, nas pectinas da laranja, foi estimada a ocorrência de apenas 15-40 unidades repetitivas de $[\rightarrow 2)\text{Rhap}-(1\rightarrow 4)\text{-GalpA}-(1\rightarrow]$ (YAPO, 2011a). A razão

entre ramnose e ácidos urônicos foi de aproximadamente 0,02 em *Chaenomeles japônica*, indicando também baixa proporção de RG-I nestas frutas (THOMAS e THIBAULT, 2002). Yapo (2009) sugeriu ainda que a proporção de RG-I para HG varia entre monocotiledôneas e dicotiledôneas, com maiores porcentagens de RG-I em relação a HG em dicotiledôneas. O tamanho das cadeias de HG também parecem ser maiores em dicotiledôneas (93-102 unidades de GalA) do que em monocotiledôneas (59-67 unidades de GalA) (YAPO, 2009).

Além das frutas citadas anteriormente, a presença de RG-I foi detectada em frutos como morango (LEGENTIL *et al.*, 1995), nêspira (FERMENIA *et al.*, 1998), manga (IAGHER *et al.*, 2002; KRATCHANOVA *et al.*, 1991), *Diospyros kaki* (ASGAR *et al.*, 2004), mirtilo (HILZ *et al.*, 2005), cassis (HILZ *et al.*, 2005), noni (BUI *et al.*, 2006), frutos de *Ziziphus jujuba* (ZHAO *et al.*, 2006), limão, maracujá, banana, abacaxi (YAPO, 2009), entre outros.

Por outro lado, a presença de ramnogalacturonanas do tipo II em frutas tem sido pouco relatada em literatura. Na uva, esta estrutura corresponde a <5% da sua polpa (NUNAN *et al.*, 1998) e pele (LECAS e BRILLOUET, 1994). Aboughe-Angone (2008) também encontraram esta estrutura na forma de dímeros em *Argania spinosa*.

Com relação às cadeias de ramificação neutras de pectinas, arabinanas foram as principais estruturas identificadas no tecido albedo do limão (ROS *et al.*, 1998), cassis (HILZ *et al.*, 2005) e polpa de maçã (MIN *et al.*, 2011). Por outro lado, galactanas foram as principais ramificações de RG-I em *Citrus depressa*, sendo formadas por unidades de galactose (1→4), (1→6), (1→3) e (1→3,6) ligadas (TAMAKI *et al.*, 2008). Galactanas também foram as principais cadeias de ramificação neutras na manga, formada principalmente por unidades de galactose (1→4) ligadas (YASHODA *et al.*, 2005). Por fim, no morango (LEGENTIL *et al.*, 1995), noni (*Morinda citrifolia*) (BUI *et al.*, 2006), uva (SAULNIER *et al.*, 1988), nêspira (FERMENIA *et al.*, 1998), cajá (*Spondias cytherea*) (IACOMINI *et al.*, 2005), limão, maracujá, banana e abacaxi (YAPO, 2009), arabinogalactanas foram as principais cadeias de ramificações de RG-I.

No abacaxi, que se pertence à classe das monocotiledôneas, diferente das demais frutas onde o principal componente é normalmente péctico,

glucuronoarabinosilanas representam o principal polissacarídeo não celulósico, com cadeia principal formada por xilose (1→4) ligada, substituída em O-3 por arabinose e em O-2 por glucose ou seu derivado metilado. Em menores concentrações foram identificadas xiloglucanas (16%) e pequenas porções de polissacarídeos pectícos (6%) e glucomanas (5%). Devido a sua baixa concentração de pectinas, o conteúdo de ácidos urônicos no fruto foi de 6-8%, sendo estes galacturônicos e glucurônicos, com aproximadamente 2% de glucurônicos metilados na posição O-4 (SMITH e HARRIS, 1995).

Xiloglucanas são os principais polissacarídeos hemicelulósicos na uva, pera, maçã, laranja lima, abóbora e maracujá, manga, nêspera, uva e *Limonia acidissima* (DOCO *et al.*, 2003; FERMENIA *et al.*, 1998; FISSORE *et al.*, 2007; MONDAL *et al.*, 2002; YASHODA *et al.*, 2005), contendo variações estruturais entre espécies. Na manga, a cadeia principal formada por unidades de β -glucose (1→4) ligadas está substituída por arabinose e xilose (YASHODA *et al.*, 2005), na nêspera apenas por xilose (FERMENIA *et al.*, 1998), na uva, goiaba, mirtilo e cassis por xilose, galactose e fucose (DOCO *et al.*, 2003; HILZ *et al.*, 2005; MARCELIN *et al.*, 1993) e no noni (*Morinda citrifolia*) por xilose e fucose (BUI *et al.*, 2006). Na polpa de *Argania spinosa*, a caracterização estrutural de uma xiloglucana foi realizada usando enzimas específicas que mostraram XXGG, XXXG, XXLG e XLLG como principais subunidades oligossacarídicas na proporção de 0,6:0,1:1,2:1,6 (ABOUGHE-ANGONE *et al.*, 2008).

Mais raramente, outros polissacarídeos hemicelulósicos são encontrados em frutas. No babaçu foi constatada a presença de uma α -glucana (1→4) ligada altamente ramificada, com principais pontos de ramificação em O-3 e O-6 (SILVA e PARENTE, 2001). Em extratos alcalinos de *Limonia acidissima*, xilose e manose foram os principais monossacarídeos, indicando a provável presença de xilanas e mananas (THOMAS e THIBAUT, 2002). Em frutos de *Mori albae*, a cadeia principal é formada por mananas (1→3) ligadas com ramificações de unidades de galactose e glucose na posição O-6 da cadeia principal (WEI *et al.*, 2007). Heteromananas com cadeia principal formada por unidades de manose (1→4) ligadas também foram encontradas em pequenas quantidades no noni (*Morinda citrifolia*) e polpa de *Melia*

azedarach (BUI *et al.*, 2006; HE *et al.*, 2009). Nesta última, o polissacarídeo isolado apresentou arabinose e manose em razão molar de 1,3:1,0 com cadeia principal de unidades de manose (1→4) ligadas e ramificações em O-6 por unidades de arabinose (1→6) ligadas (HE *et al.*, 2009).

3.3.3.1 Polissacarídeos do gênero *Prunus*

Poucos artigos tratam da elucidação da estrutura química de polissacarídeos de frutos pertencentes ao gênero *Prunus*. Kurz e colaboradores (2008) ao comparar a composição monossacarídica de polissacarídeos pécticos extraídos sequencialmente do damasco (*Prunus armeniaca*) e pêssgo (*Prunus pérsica*), encontraram como principais monossacarídeos neutros arabinose e galactose em ambos os frutos. O conteúdo de arabinose variou entre 36,7-47,3% no damasco e 41,9-48,2% em pêssgos. O conteúdo de galactose foi de 19,6-22,8% e 22,6-26,4% no damasco e pêssgo respectivamente. Estes monossacarídeos são tipicamente encontrados em pectinas presentes na polpa de espécies do gênero *Prunus* (BRUMMELL *et al.*, 2004; HEGDE e MANESS, 1996; 1998; MURAMATSU *et al.*, 2004). Mais recentemente, a estrutura química fina de polissacarídeos do pêssgo foi analisada e a presença de uma arabinogalactana do tipo II com razão molar de 4,1:5,0 entre unidades de arabinose e galactose, respectivamente, foi encontrada (SIMAS-TOSIN *et al.*, 2012). Nas amêndoas (*Prunus dulcis*), uma fração péctica rica em arabinanas foi encontrada, com razão molar de 5:2:1 para arabinose, ácidos urônicos e xilose, respectivamente. Análises de metilação e RMN da fração, indicaram a presença de unidades de arabinose terminal e ligadas em O-5, O-3,5 e O-2,3,5 na proporção de 3:2:1:1, em uma estrutura de possivelmente sete unidades repetitivos (DOURADO *et al.*, 2006; DOURADO *et al.*, 2004). Com relação às hemiceluloses, foi encontrado nas cerejas (*Prunus cerasus*) maior teor de xilose se comparado ao damasco e pêssgo (FÜGEL *et al.*, 2004; KURZ *et al.*, 2008). Em estudo realizado por Odonmazig e Badgaa (1990) com o damasco, uma xilana ácida foi obtida a partir do extrato alcalino da polpa. A fração isolada teve como cadeia principal unidades de xilose (1→4) ligadas, com unidades de ácido 4-*O*-metil-D-glucurônico ligadas na posição O-2 das unidades da

cadeia principal, caracterizando assim uma 4-*O*-metil-D-glucurono-D-xilana (ODONMAZIG e BADGAA, 1990).

Com relação às ameixas, Taylor e colaboradores (1994) após extração sequencial com água, soluções de CDTA e NaOH, verificaram a presença de galactose e arabinose como principais açúcares neutros em todos os extratos. Ito e Kato (2002) observaram a presença de xiloglucanas e sugeriram, por meio da ação de enzimas específicas, a presença de uma fucogalactoxiloglucana. Manganaris e colaboradores (2008) compararam a composição de frutos da ameixa-japonesa (*Prunus salicina*) com amadurecimento normal e de frutos da mesma espécie com injúrias, e encontraram galactose como principal açúcar neutro em ambas as situações. Nunes e colaboradores (2008) realizaram extração sequencial em ameixas da variedade "Rainha Claudia Verde" (*Prunus domestica*) e observaram a presença ácido urônico como açúcar principal nos extratos aquosos, seguido de arabinose, galactose (em concentrações próximas), além de conteúdo significativo de glucose. Foi notado ainda que altas quantidades de galactose e arabinose estiveram presente antes e após tratamentos alcalinos. Além disso, a presença de glucose, galactose e fucose, juntamente com xilose em todas as frações extraídas com KOH sugeriu a presença de xiloglucanas nestas frações. Renard e Ginies (2009) realizaram uma comparação entre a composição monossacarídica de cinco diferentes variedades de ameixa (Prune Rouge, Golden Japan, Reine Claude, Mirabelle e Questche), e encontraram como principal açúcar o ácido urônico (224-322 mg / g de sólidos insolúveis em etanol-AIS) seguido de galactose e arabinose (85-191 e 35-88 mg/g de AIS, respectivamente) (RENARD e GINIES, 2009). Apesar dos estudos realizados, a elucidação da estrutura química fina dos polissacarídeos da ameixa ainda não foi descrita na literatura.

3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA AMEIXA SECA (*Prunus domestica*)

As atividades biológicas da ameixa têm sido foco de diversas pesquisas. Estudos recentes mostraram evidência clínica da sua atividade no tratamento da hepatite (AHMED, SADIA, KHALID, *et al.*, 2010), hipertensão (AHMED, SADIA,

BATOOL, *et al.*, 2010) e osteoporose (HOOSHMAND e ARJMANDI, 2009). Ensaios em modelos animais e *in vitro* sugerem a atividade antioxidante de seus compostos fenólicos (KAYANO *et al.*, 2004). Foi demonstrado também que as fibras da ameixa seca são capazes de reduzir lipídeos do plasma e fígado (TINKER *et al.*, 1994) e são provavelmente o componente mais importante responsável pela saciedade promovida pelo seu consumo (FARAJIAN *et al.*, 2010). Com relação ao trato gastrointestinal, as ameixas têm demonstrado efeitos benéficos no alívio da constipação intestinal, mas pouco se sabe sobre seu efeito em distúrbios gástricos (STACEWICZ-SAPUNTZAKIS *et al.*, 2011).

3.5 FISIOLOGIA DO TRATO GASTROINTESTINAL E ÚLCERA GÁSTRICA

O trato gastrointestinal é um tubo muscular com um epitélio especializado que se estende desde a faringe posterior até o ânus. Além de serem responsáveis pela digestão, absorção e excreção das substâncias ingeridas, os órgãos que pertencem ao trato gastrointestinal também coordenam o maior número de células endócrinas e imunes do organismo (AHLMAN e NILSSON, 2001; GILBERT, 1994). O trato gastrointestinal é frequentemente exposto a estímulos nocivos que podem causar lesões. Estes estímulos podem ser provocados por anti-inflamatórios não esteroidais, álcool, alimentos em várias temperaturas, infecções por *Helicobacter pylori*, lesões relacionadas à isquemia/reperfusão e fatores endógenos como a produção fisiológica de ácido gástrico ou alterações de mucosa provocadas por estresse. Em contrapartida a estes estímulos nocivos, a mucosa gastrointestinal apresenta fatores de proteção como a produção de muco, secreção de HCO_3^- , enzimas com ação antioxidante, componentes envolvidos no processo inflamatório, ação de prostaglandinas e alteração da microcirculação sanguínea para remoção de toxinas (ALLEN, 1989; ALLEN e HOSKINS, 1988; DING *et al.*, 1997; DONG e KAUNITZ, 2006; FLEMSTROM, 1987; FORSTNER e FORSTNER, 1994; HOGAN *et al.*, 1993; WALLACE, 2001).

A úlcera péptica é causada por um desequilíbrio entre fatores protetores e fatores agressores. De maneira geral, um desequilíbrio entre tais fatores culminam com

a necrose tecidual causada por isquemia da mucosa, formação de radicais livres e redução do aporte de nutrientes (BAATAR *et al.*, 2002; TARNAWSKI *et al.*, 1990). A úlcera péptica é considerada doença crônica e a recorrência anual é esperada na maioria dos casos (BRUNTON *et al.*, 2006). Entre os tratamentos farmacológicos utilizados estão a utilização de antiácidos, antagonistas de receptores H_2 de histamina e fármacos que inibem a bomba H^+/K^+ -ATPase (bomba de prótons) considerados, atualmente, os fármacos mais eficazes na supressão da secreção de ácido gástrico. Entretanto, estes fármacos, principalmente quando utilizados de forma crônica, promovem vários efeitos colaterais, entre eles a hipergastrinemia que pode estar associada ao desenvolvimento do câncer gástrico (BRUNTON *et al.*, 2006; YUAN *et al.*, 2006). Os efeitos colaterais gerados pela utilização prolongada de fármacos antiúlcera justificam os estudos para o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento da úlcera gástrica.

3.4.2 Atividade antiúlcera de polissacarídeos

Polissacarídeos têm sido investigados quanto a sua ação preventiva em úlceras gástricas. Entre as fontes de polissacarídeos brutos testados estão *Cochlospermum tinctorium* (NERGARD *et al.*, 2005), raízes de *Lupuleurum falcatum* (YAMADA *et al.*, 1991), folhas de *Panax Ginseng* (KIYOHARA *et al.*, 1994), a alga marinha *Capsosiphon fulvescens* (HWANG *et al.*, 2008), entre outros. O principal mecanismo de ação comumente atribuído a polissacarídeos é o aumento da produção de muco, conforme verificado em animais tratados com polissacarídeos de *Angelica sinensis* (YE *et al.*, 2003), *Pleurotus ostreatus* (YANG *et al.*, 2012) e bagaço da cana de açúcar (MELLINGER-SILVA *et al.*, 2011). Neste último, polissacarídeos contendo arabinoxilanas incrementaram a produção de muco em 70%, aumentando a citoproteção, com redução da úlcera gástrica em 50% (MELLINGER-SILVA *et al.*, 2011). Outros mecanismos de ação também tem sido investigados, como o aumento da glutatona, observado para os polissacarídeos da alga comestível *Hizikia* (CHOI *et al.*, 2009), bagaço de cana de açúcar (MELLINGER-SILVA *et al.*, 2011) e *Pleurotus ostreatus* (YANG *et al.*, 2012). Entre os polissacarídeos que apresentam atividade

antiúlcera estão heteroxilanas ácidas extraídas de *Maytenus ilicifolia* e *Phyllanthus niruri* (CIPRIANI *et al.*, 2008), ramnogalacturonanas do tipo I parcialmente substituídas por arabinogalactanas do tipo II extraídas do Jambu (*Acmella oleracea*) e de *Maytenus ilicifolia* (CIPRIANI *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2012), polissacarídeos ricos em arabinanas extraídos da quinoa (CORDEIRO *et al.*, 2012) e arabinogalactanas do tipo I extraídas de *Cereus peruvians* (TANAKA *et al.*, 2010) e da soja (CIPRIANI *et al.*, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL DE ESTUDO

Ameixas secas (*Prunus domestica*) industrializadas da marca La Violetera[®] foram adquiridos no mercado municipal de Curitiba/PR.

4.2. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Foram utilizados 2 kg de ameixa seca sem caroço para a extração dos polissacarídeos. Para cálculo da umidade da amostra, parte das ameixas secas (80g) foi congelada e liofilizada e o teor de água calculado com base na diferença entre o peso úmido inicial e peso seco após liofilização.

Em um primeiro momento, para extração a frio, os frutos foram imersos em 4L de água a temperatura ambiente por 24 horas, seguidos de filtração, onde a fração eluída foi denominada PWC. A polpa retida foi triturada com água no liquidificador até a formação de um material homogêneo. Este resíduo foi submetido à extração aquosa à quente sob refluxo, em banho Maria em ebulição durante 2 horas. Após este processo, o material foi centrifugado (8000 rpm / 15 °C / 15 min) gerando um extrato, denominado PWH, e um resíduo insolúvel. Este resíduo foi sucessivamente submetido ao processo de extração à quente acima descrito, resultando em 23 extrações. Todos os extratos da extração aquosa a quente, foram reunidos em uma única fração.

As amostras PWH e PWC foram precipitadas com etanol (3 x vol.) para a retirada dos compostos de baixa massa molar. O material precipitado foi recuperado por centrifugação (8000 rpm / 15 °C / 15 min), dialisado em sacos de diálise de 12 kDa, concentrado em rotaevaporador e liofilizado.

No resíduo obtido após todas as extrações aquosas, foi realizada extração alcalina (KOH 10%) sob refluxo por 2 horas em banho Maria em ebulição. Após este

processo, o material foi centrifugado (8000 rpm / 15 °C / 15 min) gerando um extrato, denominado PK, e um resíduo insolúvel. Este procedimento foi repetido por 3 vezes. Os extratos alcalinos, após reunidos foram neutralizados com ácido acético até pH 7 e, posteriormente, dialisados por 48 horas em sacos de diálise de 12 kDa. A Figura 4 apresenta esquematicamente os processos anteriormente descritos.

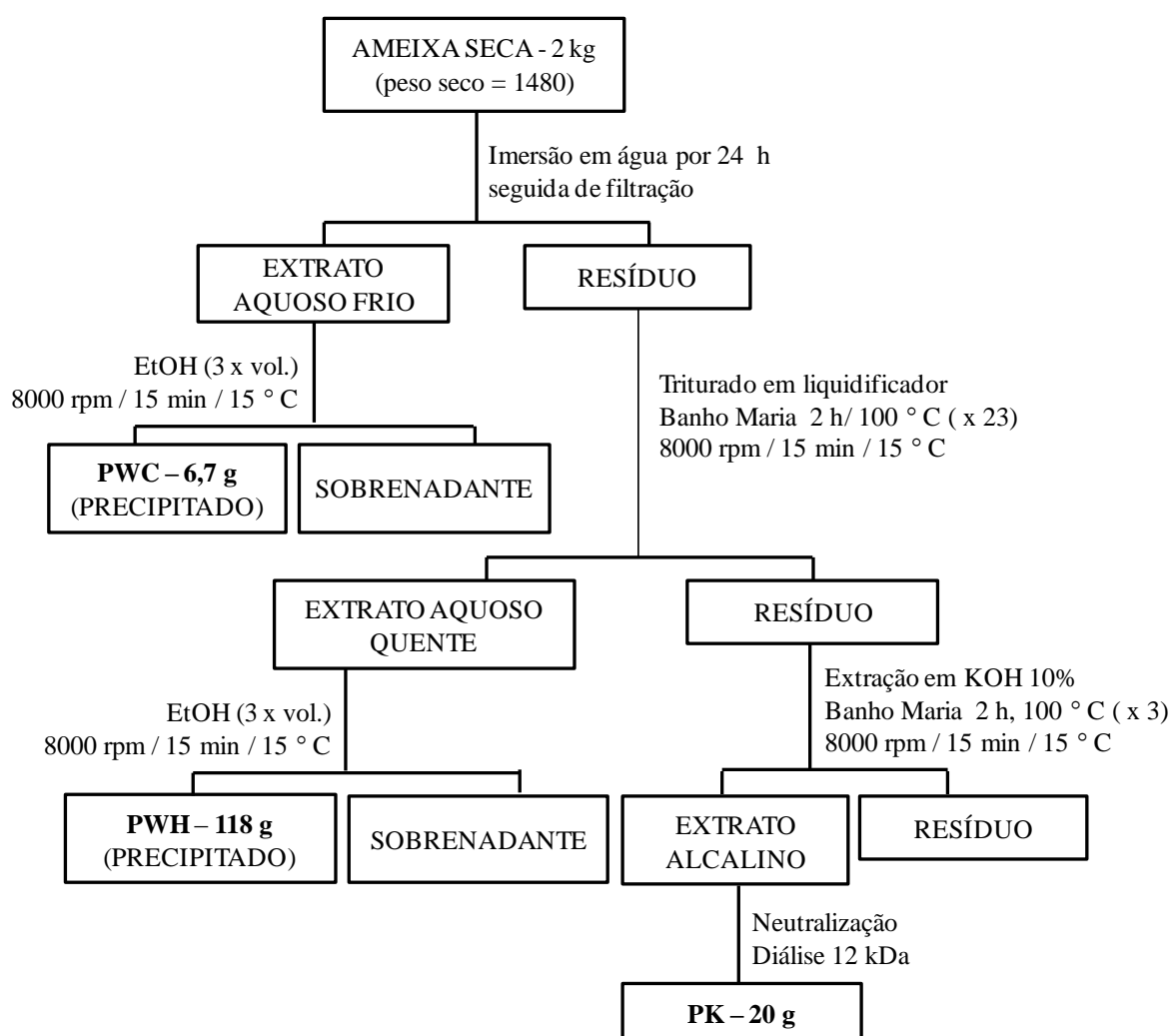


FIGURA 4. FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO AQUOSA E ALCALINA DA AMEIXA SECA (*Prunus domestica*)

4.3. PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos obtidos a partir das extrações aquosas e alcalinas foram submetidos a diversos processos de purificação. Os processos de purificação utilizados nesse trabalho estão descritos a seguir e foram acompanhados pela análise da composição monossacarídica, bem como por análises de HPSEC e RMN-¹³C de todas as frações obtidas durante a purificação.

4.3.1. Fracionamento dos polissacarídeos por congelamento e descongelamento

As frações PWC, PWH e PK foram submetidas ao processo de congelamento e descongelamento, que consiste em solubilizar a amostra em água destilada e, posteriormente, congelá-la. Após congelamento, a amostra é retirada do freezer e permanece à temperatura ambiente até completo descongelamento, sendo o material insolúvel em água fria retirado por centrifugação (GORIN e IACOMINI, 1984). Esse processo foi repetido diversas vezes, até que a partir do sobrenadante aquoso não se formasse mais precipitado após congelamento e descongelamento, e, a partir do resíduo aquoso após solubilização em água, fosse obtido um sobrenadante límpido. Após essas etapas, os sobrenadantes e precipitados foram reunidos, concentrados e liofilizados. Nas frações PWC e PWH não houve formação de material precipitado, enquanto que a fração PK, após centrifugação rendeu a fração sobrenadante (SPK) e a fração precipitada (PPK) (Figura 16, pg 66).

4.3.2. Fracionamento dos polissacarídeos pelo método de Fehling

As frações PWH e SPK foram submetidas ao fracionamento pelo método de Fehling (JONES e STOODLEY, 1965). Primeiramente as frações foram solubilizadas em um mínimo volume de água. A esta amostra solúvel, foi adicionado o mesmo volume de solução de Fehling, sendo metade do volume proveniente da solução A (sulfato de cobre) e metade da solução B (KOH + tartarato de sódio e potássio). Após forte agitação manual, o material foi mantido sob refrigeração por no mínimo 4 horas e

o precipitado obtido foi separado do sobrenadante por centrifugação (10.000 rpm / 15 min / 25 °C). Tanto o precipitado quanto o sobrenadante foram neutralizados com ácido acético, dialisados em sacos de diálise de 12 kDa por 24 horas, agitados em suspensão aquosa de resina catiônica fortemente ácida para eliminar o cobre residual, e novamente dialisados sob as mesmas condições citadas anteriormente. A fração PWH deu origem à fração sobrenadante SF-PWH e à fração precipitada PF-PWH e, a fração SPK, deu origem à fração sobrenadante SF-SPK e à fração precipitada PF-SPK (Figura 16, pg 66). Entretanto, durante a etapa de diálise de SF-PWH e PF-PWH, foi observada a presença de material insolúvel em ambas as frações, e, por esse motivo, as mesmas foram submetidas novamente à centrifugação (10.000 rpm / 15 min / 25 °C). A partir do precipitado de Fehling foram geradas as frações precipitada PPF-PWH, e sobrenadante SPF-PWH. A partir do sobrenadante de Fehling foram geradas as frações precipitada PSF-PWH e sobrenadante, SSF-PWH. As frações resultantes do tratamento com solução de Fehling foram então concentradas e liofilizadas.

4.3.3. Fracionamento dos polissacarídeos por ultrafiltração

Os polissacarídeos SPF-PWH, SSF-PWH e SF-SPK foram purificados quanto à sua massa molar utilizando ultrafiltração em membranas (Millipore) com limite de exclusão pré-determinado (10 a 100 kDa) (Figura 8, pg 56; Figura 16, pg 66). As ultrafiltrações foram realizadas por um sistema de filtração modelo 16249 (Sartorius), acoplado a um cilindro de ar comprimido.

4.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS

4.4.1 Composição monossacarídica

As composições monossacarídicas foram determinadas após a hidrólise de 2 mg dos polissacarídeos, com 1 mL de TFA 2 M, a 100 °C em estufa, por 8 h. As soluções foram evaporadas até a secura e o resíduo dissolvido em 1 mL de H₂O, ao qual 2 mg

de NaBH_4 foi adicionado (WOLFROM e THOMPSON, 1963b). Após 18 h, foi adicionado ácido acético e as soluções foram evaporadas até a secura. Os alditóis obtidos foram acetilados com uma mistura de anidrido acético-piridina (1:1 v/v; 2 mL) (WOLFROM e THOMPSON, 1963a), à temperatura ambiente *overnight* ou à 100° C por 30 minutos. As reações foram interrompidas com gelo e os acetatos de alditóis extraídos com clorofórmio, o qual foi lavado diversas vezes com solução aquosa de CuSO_4 a 5% para a eliminação da piridina residual. Por fim, a fase clorofórmica foi desidratada com Na_2CO_3 anidro, filtrada e evaporada à temperatura ambiente. Os acetatos de alditóis foram analisados por GC-MS e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons.

4.4.2 Determinação de homogeneidade e massa molar (M_w)

A análise de homogeneidade e a determinação da massa molar das amostras foram realizadas em HPSEC, que utiliza um cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo WATERS 2410, acoplado a um detector de índice de refração. Foram utilizadas quatro colunas WATERS Ultrahydrogel dispostas de forma sequencial e apresentando diferentes limites de exclusão: 7×10^6 (coluna 2000); 4×10^5 (coluna 500); 8×10^4 (coluna 250) e 5×10^3 (coluna 120). O eluente, NaNO_2 0,1 M com NaN_3 a 0,02 % (m/v), foi injetado na coluna através de uma bomba peristáltica WATERS 515.

As amostras foram solubilizadas em NaNO_2 0,1 M e ultrafiltradas em membranas de acetato de celulose (MILLIPORE), de porosidade 0,22 μm . Para o cálculo da massa molar, as amostras purificadas tiveram seu valor de dn/dc (taxa de variação do índice de refração com relação à concentração) determinado, já que este valor é específico para cada amostra. O cálculo do dn/dc e da massa molar foi feito através do software ASTRA 4.70.07.

4.4.3 Metilação dos polissacarídeos e análise na forma de acetatos de alditóis

A metilação dos polissacarídeos foi realizada segundo Ciucanu e Kerek (1984), onde 5 a 10 mg da amostra foram solubilizadas em Me_2SO (2 mL) sendo, após completa dissolução, adicionadas de NaOH pulverizada (em excesso) e 2 mL de iodeto de metila (CH_3I). A mistura reacional permaneceu sob agitação (em vórtex) durante 30 min sendo, posteriormente, mantida em repouso *overnight*. Após repouso, o procedimento foi novamente repetido sobre a mesma mistura para garantir a metilação total dos polissacarídeos.

A metilação foi interrompida com água destilada sob banho de gelo e a solução acidificada com ácido acético. O polissacarídeo parcialmente metilado foi extraído com clorofórmio e lavado diversas vezes com água destilada e a fase clorofórmica evaporada. Os polissacarídeos parcialmente metilados resultantes foram primeiramente pré-hidrolisados com uma solução de ácido clorídrico em metanol a 3,5 % (v/v, 2 mL) por 2 h a 80 °C. O ácido foi eliminado com a adição de carbonato de prata (Ag_2CO_3) seguida de filtração, e o resíduo lavado com metanol e evaporado até à secura em temperatura ambiente. Depois, foi realizada a hidrólise do material com 1,5 mL de ácido sulfúrico 0,5 M, durante 16 h, a 100 °C para frações provenientes de extração aquosa (AGI-50E e AGI-50R) e durante 12 h, a 100 °C para a fração proveniente da extração alcalina (PF-SPK-100R) (Figura 16, pg 66). O excesso de ácido sulfúrico foi eliminado com carbonato de bário (BaCO_3). Após centrifugação, o sobrenadante límpido foi reduzido com NaBD_4 (WOLFROM e THOMPSON, 1963b) e acetilado com uma mistura de anidrido acético-piridina (1:1 v/v; 2 mL) (WOLFROM e THOMPSON, 1963a), à temperatura ambiente, *overnight*. A reação foi interrompida com gelo e a amostra extraída com clorofórmio, o qual foi lavado diversas vezes com solução aquosa de CuSO_4 a 5% para a eliminação da piridina residual. Por fim, a fase clorofórmica foi desidratada com Na_2CO_3 anidro, filtrada e evaporada à temperatura ambiente.

Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por GC-MS e identificados pelo tempo de retenção e perfil dos fragmentos de massa (SASSAKI *et al.*, 2005).

4.4.4. Carboxirredução

O processo de carboxirredução foi realizado segundo Taylor e Conrad (1972), e consiste na reação de ácidos carboxílicos com carbodiimidas, gerando ésteres que podem ser reduzidos na presença de NaBH_4 . Neste caso, as unidades de ácidos urônicos de um polissacarídeo são convertidas no seu açúcar neutro correspondente. Foram dissolvidos 10 mg do polissacarídeo a sofrer carboxirredução em 10 mL de tampão MÊS [ácido 2-(*N*-morfolina)-etanosulfônico] (0,2 M, pH 4,75) e a este foram adicionados, pouco a pouco e sob agitação, 24 mg de carbodiimida [ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida] para cada 1 mg de ácido urônico contido na amostra. A mistura foi agitada por um total de duas horas. Em seguida, foi adicionado tampão TRIS (2 M, pH 7,0) até pH 7,0 e, posteriormente, NaBH_4 para uma concentração final de 2 M. A redução ocorreu *overnight* e foi interrompida pela adição de ácido acético até pH 5. Finalmente, o material foi dialisado em membranas com limite de exclusão de 8.000 kDa durante 48 horas, concentrado e liofilizado. Todo o processo de carboxirredução foi repetido mais uma vez, para garantir a eficácia do procedimento. A única diferença foi que, no segundo processo, apenas a metade de carbodiimida foi utilizada.

4.4.5 Métodos analíticos

4.4.5.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

Os componentes monossacarídicos foram quantificados através de GC-MS, utilizando-se um cromatógrafo a gás Varian Sarturn 2000R - modelo 3.800 acoplado a um espectrômetro de massa de marca Varian Ion – Trap 2000R, equipados com colunas capilares de sílica fundida DB – 225 (30 m x 0,25 mm). Hélio ultrapuro, foi usado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min. As injeções nas colunas foram feitas partindo-se de 50 °C (mantida por 1,0 min), seguindo-se de um aumento gradual de 40 °C/min até 210 °C e mantido por 30 minutos (acetatos de alditóis parcialmente

O-metilados) ou 230 °C e mantido por 15 minutos (acetatos de alditóis), sendo mantida isotermicamente até o final da análise.

4.4.5.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

As amostras previamente liofilizadas foram solubilizadas em D₂O e transferidas para tubos de 5 mm de diâmetro. Os espectros de RMN-¹³C e RMN-¹H foram adquiridos em aparelho BRUKER 400 MHz, modelo DRX Avance, 70 °C, com ressonância em 100,24 MHz (para ¹³C) e 400,13 MHz (para ¹H). Os deslocamentos químicos foram expressos em δ PPM, baseando-se no padrão interno da acetona (δ 30,2) para ¹³C e do D₂O (δ 4,20) para ¹H.

4.4.5.3 Dosagem de ácidos urônicos

A dosagem de ácido urônico foi realizada pelo método descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Em 400 µl de amostra (1 mg/mL) foram adicionados 40 µl de solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 M (pH 1,6) e, em seguida, 2,4 mL de tetraborato de sódio (75 mmol/l em H₂SO₄). A solução foi agitada em vórtex e aquecida em banho-maria fervente por 20 min. Após resfriamento, 80 µl de *m*-hidroxibifenil (0,15% m/v em NaOH 0,5% m/v) foram adicionados e a coloração, estável até 1 hora após sua formação, foi lida em 525 nm. A sensibilidade do método é de 0,97 a 38,8 µg de ácido urônico. O ácido galacturônico foi utilizado como padrão por ser o mais comumente encontrado em polissacarídeos de plantas.

4.4.5.4 Cromatografia em camada delgada

Frações ricas em ácidos urônicos, após serem hidrolisadas, foram analisadas por cromatografia em camada delgada para distinção qualitativa da presença dos ácidos galacturônico e glucurônico. As análises foram realizadas em placas de sílica-gel 60G (Merck), espessura de 0,2 mm de sílica, com 11 cm de altura total (10 cm a partir da origem). A fração PPF-PWH foi hidrolisada conforme descrito no item 4.4.1 da

metodologia, e comparada com padrão de glucose e dos ácidos glucurônico e galacturônico. A fase móvel utilizada foi EtOAc:*n*-PrOH:AcOH:H₂O (4:2:2:1, v/v) e a visualização dos compostos foi obtida com orcinol-H₂SO₄ a 100 °C .

4.4.5.5 Determinação do grau de *O*-metil esterificação por RMN - ¹H

O grau de metil-esterificação das pectinas foi determinado utilizando o método de espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H), segundo metodologia estabelecida por Grasdalen e colaboradores (1988). A fim de promover a troca dos hidrogênios das hidroxilas por deutério e a completa remoção das moléculas de água presentes, foi realizada solubilização das amostras em D₂O e posterior congelamento e liofilização da mesma (sendo esse processo repetido por no mínimo três vezes). Após este processo, as amostras foram solubilizadas em D₂O, colocadas em tubos de RMN de 5 mm de diâmetro e analisadas por RMN-¹H. Os espectros foram obtidos a 80 °C (256 scans). Os deslocamentos químicos dos hidrogênios foram expressos em relação à ressonância do deutério (δ 4,20).

A quantificação de DE foi feita na região de baixo campo, empregando-se a seguinte equação:

$$DE (\%) = \frac{I_A - I_B}{I_A + I_B} \times 100$$

Onde I_A representa as intensidades das ressonâncias de H-1 das unidades de GalA livres assim como H-1 e H-5 das unidades de GalA esterificadas, e I_B representa a intensidade dos sinais de H-5 das unidades de GalA livres.

4.4.5.6. Determinação do grau de *O*-acetil esterificação por espectrofotometria

A dosagem de acetil foi efetuada de acordo com Hestrin (1949). O método se baseia na habilidade que os grupamentos ésteres de ácido carboxílico têm de reagir quantitativamente com hidroxilamina em solução alcalina. O ácido hidroxâmico

derivado reage então quantitativamente com cloreto férrico (FeCl_3) produzindo um cromógeno laranja-amarronzado.

Primeiramente, foi utilizado 0,5 mL de amostra solubilizada em água (1mg/mL) e adicionado 1 mL de uma solução de hidroxilamina 2 M e hidróxido de sódio 3,5 N (1:1). Em seguida adicionou-se 0,5 mL de uma solução de HCl em água (1:3) e 0,5 mL de uma solução de cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,37 M em HCl 0,1 N.

Os ensaios foram realizados em triplicata e como padrão foram utilizadas soluções de β -D-galactose pentaacetato nas concentrações de 0,1 – 0,8 mg/mL e leitura em 540 nm. A sensibilidade do método é de 5 a 0,04 nm de éster/mL.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIÚLCERA DOS POLISSACARÍDEOS

Os ensaios biológicos foram realizados em colaboração com as professoras Maria Fernanda de Paula Werner e Cristiane Hatsuko Baggio do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.

4.5.1 Animais

Para realização dos experimentos foram utilizadas ratas Wistar com peso variando entre 180 a 200 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e foram mantidos sob condição padrão laboratorial (ciclo de 12 h dia/noite e temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$). Ração comercial e água foram disponibilizadas *ad libitum*. Os experimentos foram realizados após aprovação pelo Comitê de Ética Institucional da UFPR (autorização número 473) e foram conduzidos de acordo com os “Princípios de Cuidados com Animais de Laboratório” (NIH Publication 85-23, revisado 1985).

4.5.2 Indução de lesão gástrica aguda em ratos

As lesões gástricas foram induzidas em ratas em jejum de 18 h, por administração intragástrica de etanol, como descrito previamente por Robert e colaboradores (1979). Todos os animais foram tratados oralmente com veículo (água, 0,1 mL/100 g de peso corporal), omeprazol (40 mg/kg) ou com a fração polissacarídica PWH (3, 10 e 30 mg/kg) 1 h antes da administração do etanol P.A. (0,5 mL/200 g), e então sacrificados 1 h após administração do etanol. Para determinar a extensão da lesão gástrica o estômago foi removido, aberto, fotografado e as lesões gástricas foram mensuradas (mm²) por planimetria computadorizada usando o software Image Tool 3.0. Foram utilizados 6 a 8 animais por grupo.

4.5.3 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como médias \pm erro padrão das médias (EPM). A significância estatística foi determinada usando análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Foi considerada diferença significativa quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas pelo software Graph Pad Prism (San Diego, CA) versão 5.0, 2007.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO AQUOSA E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA AMEIXA SECA

Para cálculo da umidade da amostra, parte das ameixas secas foram congeladas e liofilizadas. O teor de água foi calculado e representou 26% da amostra. Desta forma, o peso seco estimado a partir do peso úmido inicial (2000 g) foi de 1480 g.

O suco de ameixa seca é popularmente preparado a partir da imersão dos frutos secos em água fria e utilizado no tratamento da constipação intestinal (STACEWICZ-SAPUNTZAKIS *et al.*, 2011) além de ter apresentado efeitos no tratamento da hepatite (AHMED, SADIA, KHALID, *et al.*, 2010) e hipertensão (AHMED, SADIA, BATOOL, *et al.*, 2010) em estudos clínicos. Para a obtenção dos polissacarídeos extraídos por este método, as ameixas secas foram imersas em água destilada por 24 horas, conforme descrito na metodologia, item 4.2. O extrato obtido foi concentrado em rotaevaporador e os componentes de alta massa molar foram separados dos de baixa massa por tratamento com etanol (3 vol.), o qual resultou em um precipitado denominado PWC (Figura 4).

Após extração a frio, o resíduo da ameixa, foi submetido a sucessivas extrações à quente, sob refluxo. Da mesma forma que para PWC, os extratos foram reunidos, concentrados em rotaevaporador e os componentes de alta massa molar foram separados dos de baixa massa por tratamento com etanol (3 vol.), o qual resultou em um precipitado denominado PWH (Figura 4).

As frações PWC e PWH foram submetidas a congelamento e degelo, entretanto, não houve formação de precipitado após centrifugação, indicando ausência de material insolúvel em água fria em ambas as frações.

A análise de composição monossacarídica das frações PWC e PWH indicou a presença de ácido urônico, galactose e arabinose em razão molar de 67:17:16 e 56:23:21, respectivamente (tabela 2).

TABELA 2. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DAS EXTRAÇÕES AQUOSAS DA AMEIXA SECA (*Prunus domestica*)

Frações	Rendimentos ⁽¹⁾		Monossacarídeos (%)				
	g	%	Rha	Ara	Gal	Glc	Ácidos Urônicos ⁽²⁾
PWC	6,7	0,5	-	16	17	-	67
PWH	118	8,0	-	21	23	-	56
PPF-PWH	39,3	2,7	-	9,5	4,6	1,3	84,6
SPF-PWH	19,8	1,4	2,2	45,5	28,7	1,7	21,9
SSF-PWH	18,3	1,3	2,5	53,4	29,0	2,2	12,9
AGI-50E	20,9	1,4	5,1	39,6	50,3	-	5,0
AGI-50R	13,6	0,9	10,7	47,8	31,5	-	10,0

NOTAS: Análise de acetatos de alditóis por GC-MS. (1) Partindo de 1446 g de polpa seca; (2) determinações de ácidos urônicos segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

O perfil de eluição em HPSEC se apresentou heterogêneo e foi semelhante para as frações PWC e PWH, conforme apresentado na Figura 5.

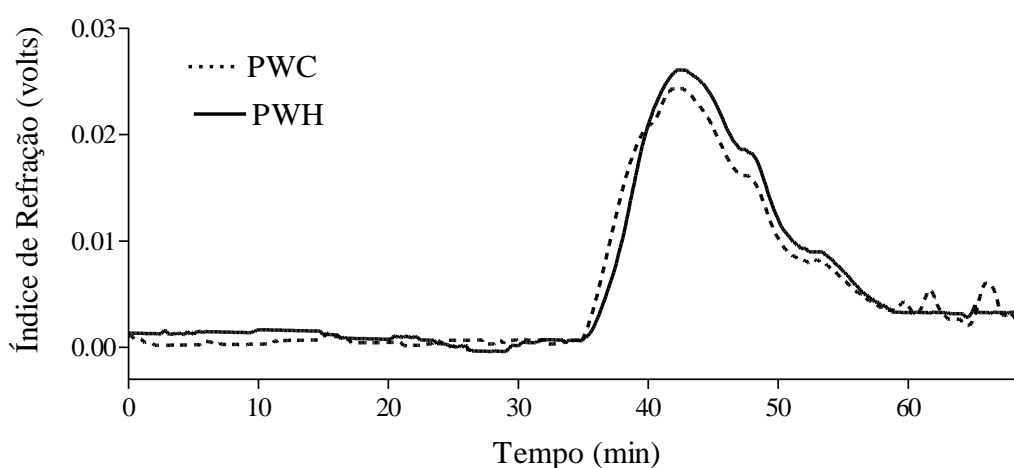


FIGURA 5. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID) DAS FRAÇÕES PWC E PWH, OBTIDAS PELO PROCESSO DE EXTRAÇÃO COM ÁGUA DA AMEIXA SECA (*Prunus domestica*).

Além do perfil de eluição em HPSEC, PWC e PWH também apresentaram semelhança nos seus espectros de RMN- ^{13}C (Figura 6A e B), que qualitativamente, apresentaram os mesmos sinais.

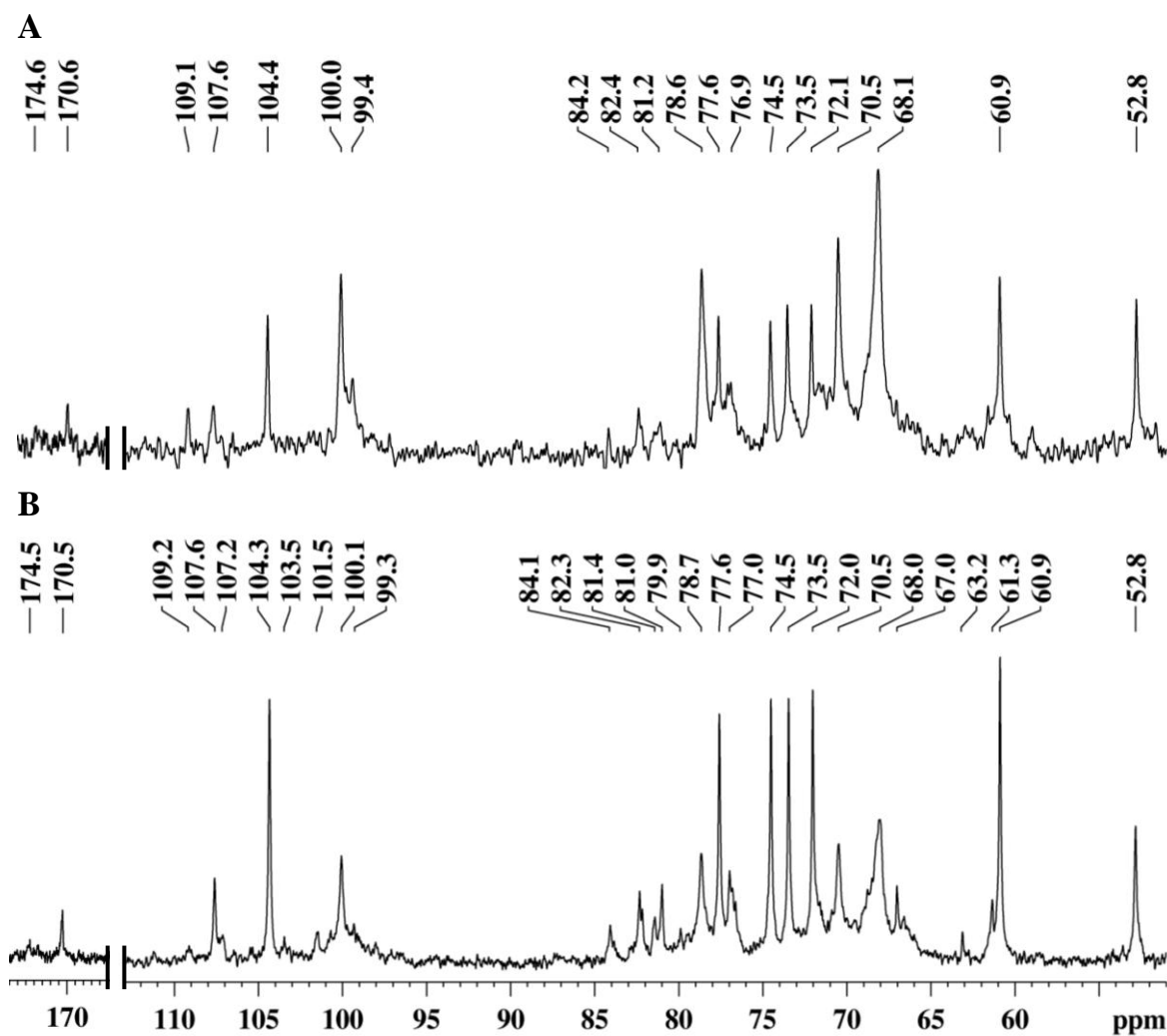


FIGURA 6. ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DE PWC(A) E PWH(B), EM D_2O , A 70 °C, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.

Os sinais em δ 104,4 (C-1), δ 77,6 (C-4), δ 74,5 (C-5), δ 73,5 (C-3), δ 72,1 (C-2) e δ 60,9 (C-6) foram atribuídos às unidades de β -D-Galp (1 \rightarrow 4) ligadas. O sinal de C-4 em campo mais baixo, quando comparado com o respectivo sinal de metil β -D-galactopiranoose, confirma que estas unidades de β -D-Galp são 4-O substituídas (BOCK e PEDERSEN, 1983). Sinais em δ 107,6 e δ 109,1 correspondem aos

carbonos anoméricos das unidades de α -L-Araf. Estes assinalamentos sugerem a presença de arabinogalactanas do tipo I (AG-I) nas frações. Além disso, podem ser observados em δ 100,0 e δ 99,4 sinais do C-1 das unidades de α -D-GalpA esterificadas e não esterificadas, respectivamente. Seus sinais de C-6 foram observados em δ 170,6 e δ 174,6, correspondentes ao carbono carboxílico metil-esterificado (COOCH_3) e não metil-esterificado (COOH), respectivamente. Os grupos metil-éster dos grupos carboxílicos (COOCH_3) apareceram em δ 52,8. Os demais sinais de α -D-GalpA referentes aos de carbono do anel aparecem em δ 78,6 (C-4 *O*-substituído), δ 70,5 (C-5) e δ 68,1 (C-2 e C-3 sobrepostos). Estes dados sugerem a presença de uma homogalacturonana parcialmente metil-esterificada. Os assinalamentos foram realizados com base em dados da literatura (CIPRIANI *et al.*, 2009; PETERSEN *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2010).

Devido à presença de unidades de α -D-GalpA metil-esterificadas, o grau de metil-esterificação (DM) foi determinado por espectroscopia de RMN- ^1H . Um valor de 56,3% foi encontrado para PWC, indicando a presença de uma pectina altamente metil-esterificada (HM). Por outro lado, a homogalacturonana extraída com água quente apresentou um valor de 26,6%, sendo classificada como uma pectina pouco metil-esterificada (LM) (Figura 7). O grau de acetilação (DA) também foi determinado (conforme item 4.4.5.6 da metodologia) e mostrou que ambas as frações (PWC e PWH) apresentaram baixo conteúdo de acetil, com valores de 2,8% e 3,1%, respectivamente.

De acordo com os dados mostrados acima, as frações PWC e PWH são frações pécticas constituídas, provavelmente, por uma mistura de arabinogalactana do tipo I e uma homogalacturonana parcialmente metil-esterificada. Entretanto, a quantidade relativa de material péctico presente na HG *versus* a quantidade de AG-I, diferiu entre as amostras. A razão de ácido urônico/(Ara+Gal) foi maior na fração PWC (2,0) se comparada a PWH (1,3), indicando maiores quantidade de AG-I na fração PWH.

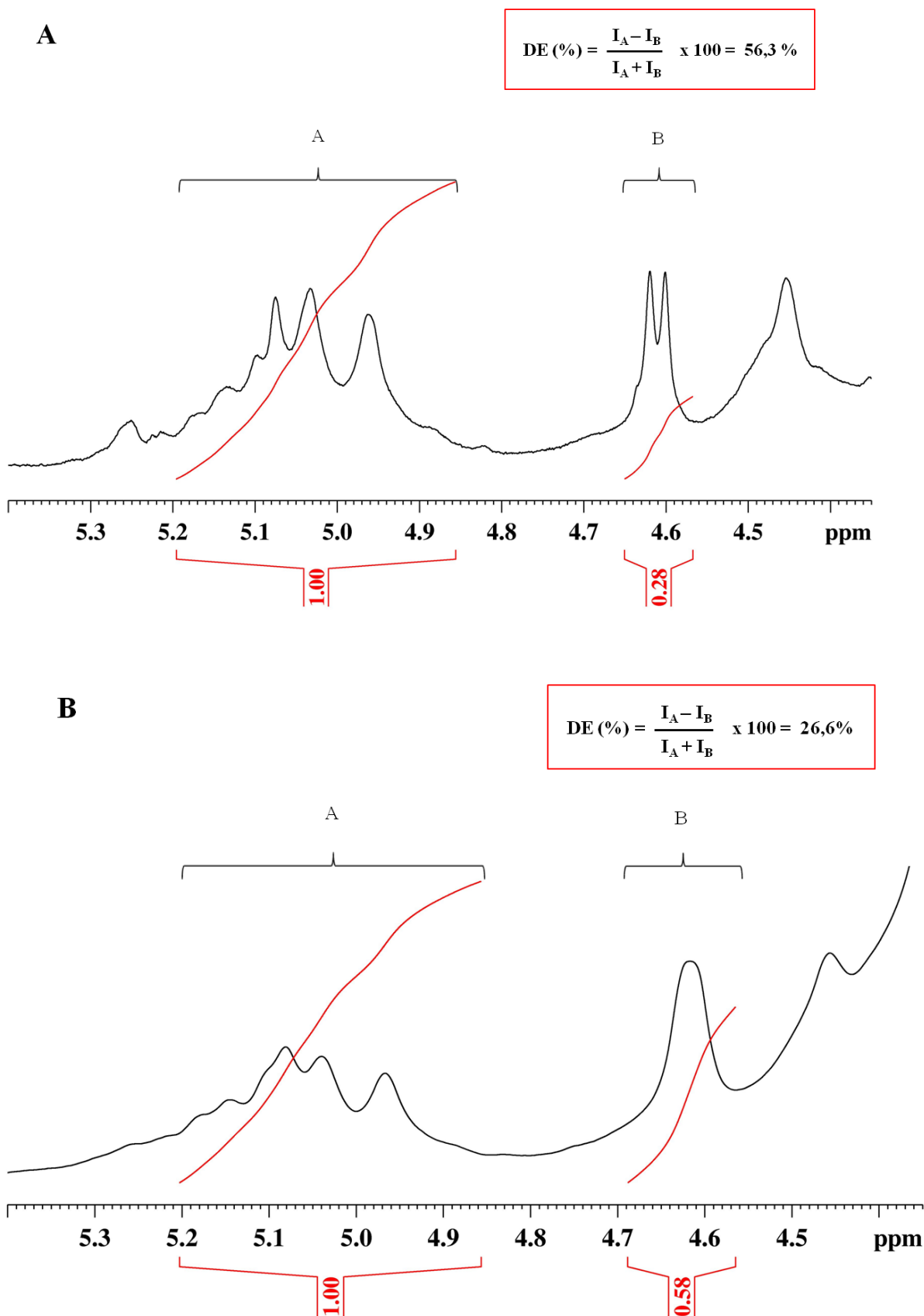


FIGURA 7. REGIÃO DE CAMPO BAIXO DO ESPECTRO DE RMN-¹H DAS FRAÇÕES FRAÇÃO PWC (A) E PWH (B)

Na tentativa de purificar os polissacarídeos na fração PWH (que apresentou maior rendimento se comparada a fração PWC) foi tratada com solução de Fehling (segundo item 4.3.2 da metodologia), uma vez que é sabido que arabinogalactanas permanecem solúveis após este tratamento, enquanto que as HG se complexam com o cobre e precipitam (CAPEK, 2008). Durante a etapa de diálise do precipitado e do sobrenadante de Fehling, foi observada a presença de material insolúvel em ambas as frações, e, por esse motivo, as frações PF-PWH e SF-PWH foram submetidas à centrifugação. A partir do precipitado de Fehling foram geradas as frações precipitada PPF-PWH, e sobrenadante SPF-PWH. A partir do sobrenadante de Fehling foram geradas as frações precipitada PSF-PWH e sobrenadante, SSF-PWH. O fluxograma resumido da purificação da fração PWH esta apresentado na Figura 8.

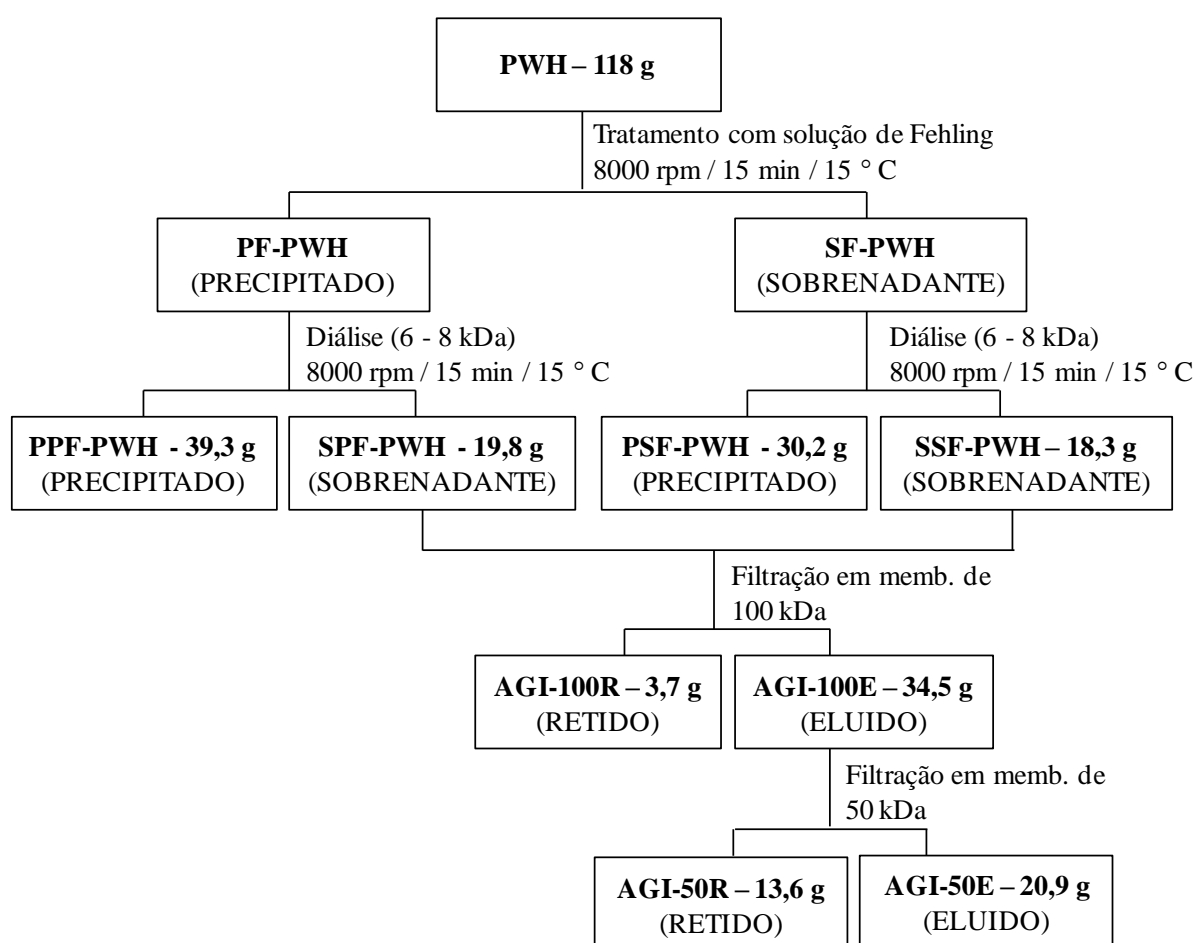


FIGURA 8. FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO AQUOSA DA AMEIXA SECA (*Prunus domestica*).

Como previsto, a fração contendo a homogalacturonana (PPF-PWH) foi precipitada pelo tratamento de Fehling. PPF-PWH mostrou-se composta majoritariamente por ácidos urônicos (Tabela 2). A identidade destes açúcares ácidos foi analisada por cromatografia em camada delgada, onde visualizou-se a presença de ácido galacturônico (Figura 9).

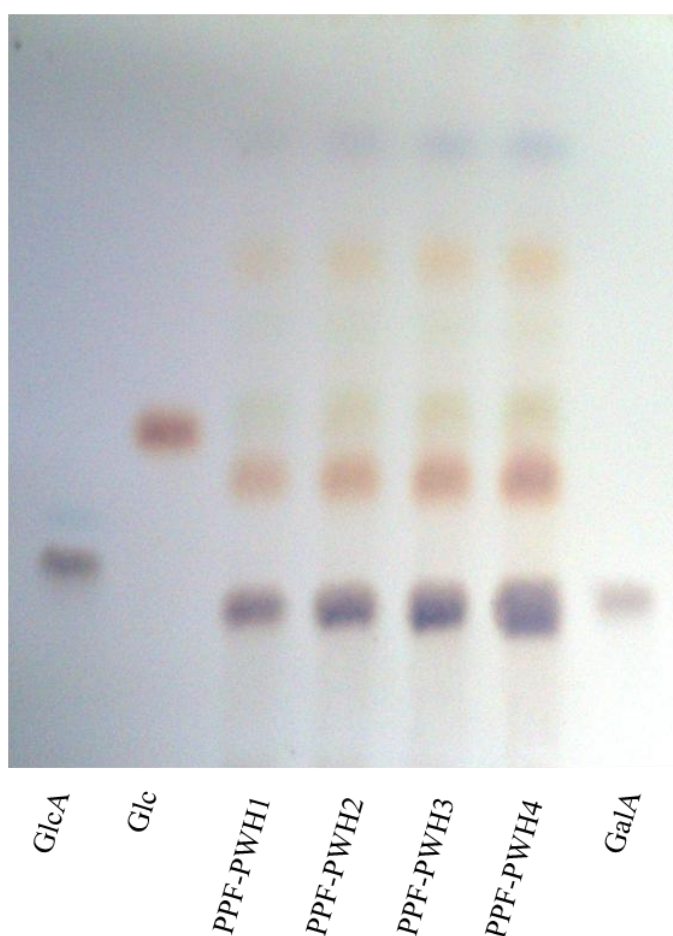


FIGURA 9. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA AMOSTRA PPF-PWH EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES (PPF-PWH1 - 4) E DOS PADRÕES ÁCIDO GLUCURÔNICO (GlcA), GLUCOSE (Glc) e ÁCIDO GALACTURÔNICO (GalA). Revelador orcinol- H_2SO_4 e fase móvel $\text{EtOAc}:n\text{-PrOH}:\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}$ (4:2:2:1).

O espectro de RMN- ^{13}C está em concordância com estes dados, uma vez que apresentou os sinais principais de homogalacturonanas em δ 98,9 (C-1), δ 69,2 (C-2), δ 68,5 (C-3), δ 78,1 (C-4 substituído), δ 71,4 (C-5) e δ 175,1 (C-6) atribuídos às unidades de α -GalpA (1 \rightarrow 4)-ligadas (Figura 10) (PETERSEN *et al.*, 2008). Devido ao

pH alcalino do reagente de Fehling, os grupos metil e acetil foram removidos, e desta maneira, houve uma modificação dos sinais em PPF-PWH no espectro de RMN- ^{13}C em relação aos mostrados na fração original (PWH). A fração apresentou ainda sinais semelhantes aos encontrados em PWH provenientes da arabinogalactana. Isto poderia indicar uma mistura de polissacarídeos ou ainda, que eles poderiam estar covalentemente ligados, formando as regiões lisas (*smooth regions*) e ramificadas (*hairy regions*) das cadeias de pectina.

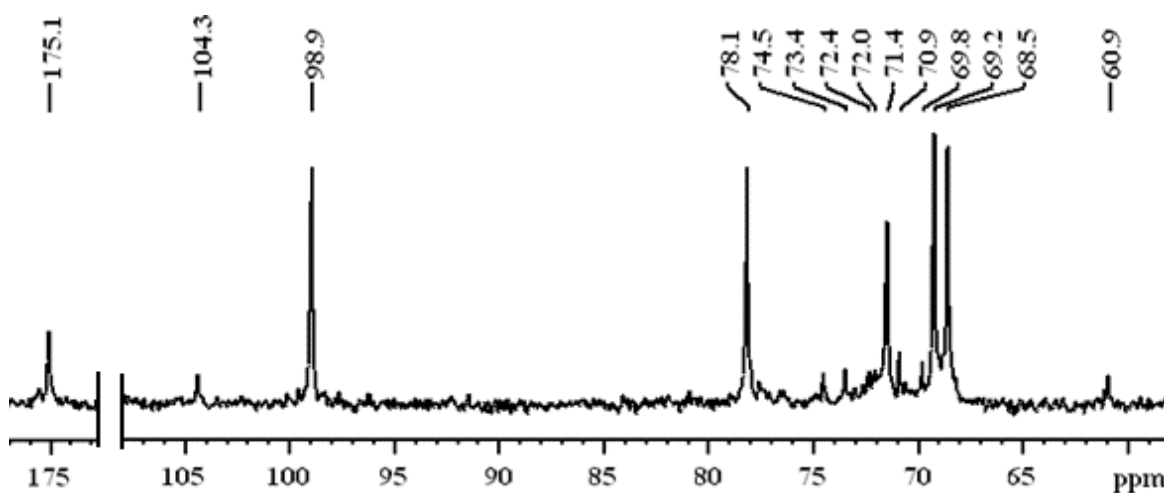


FIGURA 10. ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DE PPF-PWH, EM D_2O , A 70 °C, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.

Com relação à análise de homogeneidade das frações SSF-PWH e SPF-PWH, foi observado um perfil de eluição em HPSEC bastante similar entre as duas frações, e heterogêneo, com presença de dois picos principais distintos (Figura 11).

Da mesma forma, a composição monossacarídica das frações SSF-PWH e SPF-PWH apresentou semelhança, sendo composta por arabinose, galactose, ácidos urônicos e pequenas quantidades de ramnose e glucose em ambas as frações (Tabela 2, pg 52). Houve similaridade também em relação aos sinais nos espectros de RMN- ^{13}C (Figura 12).

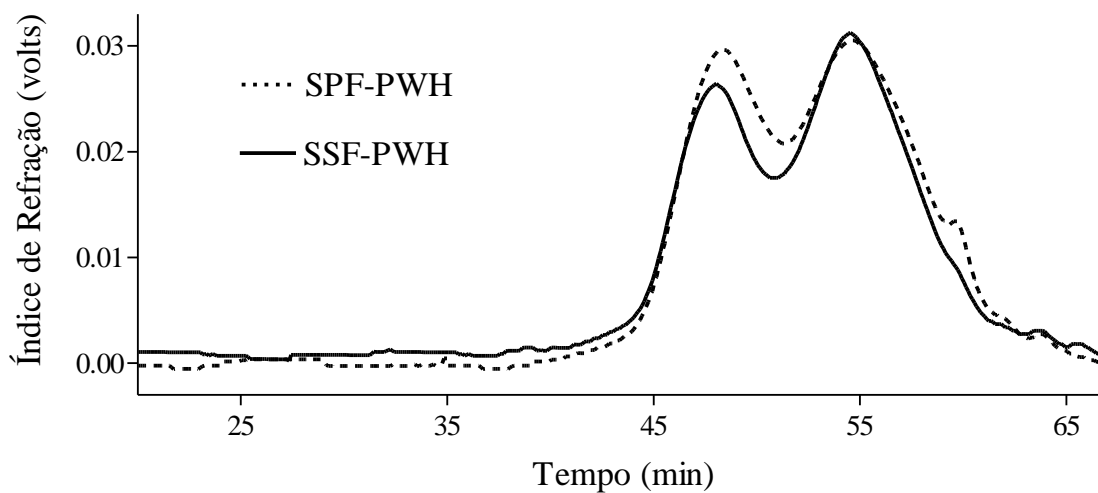


FIGURA 11. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES SPF-PWH e SSF-PWH, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID).

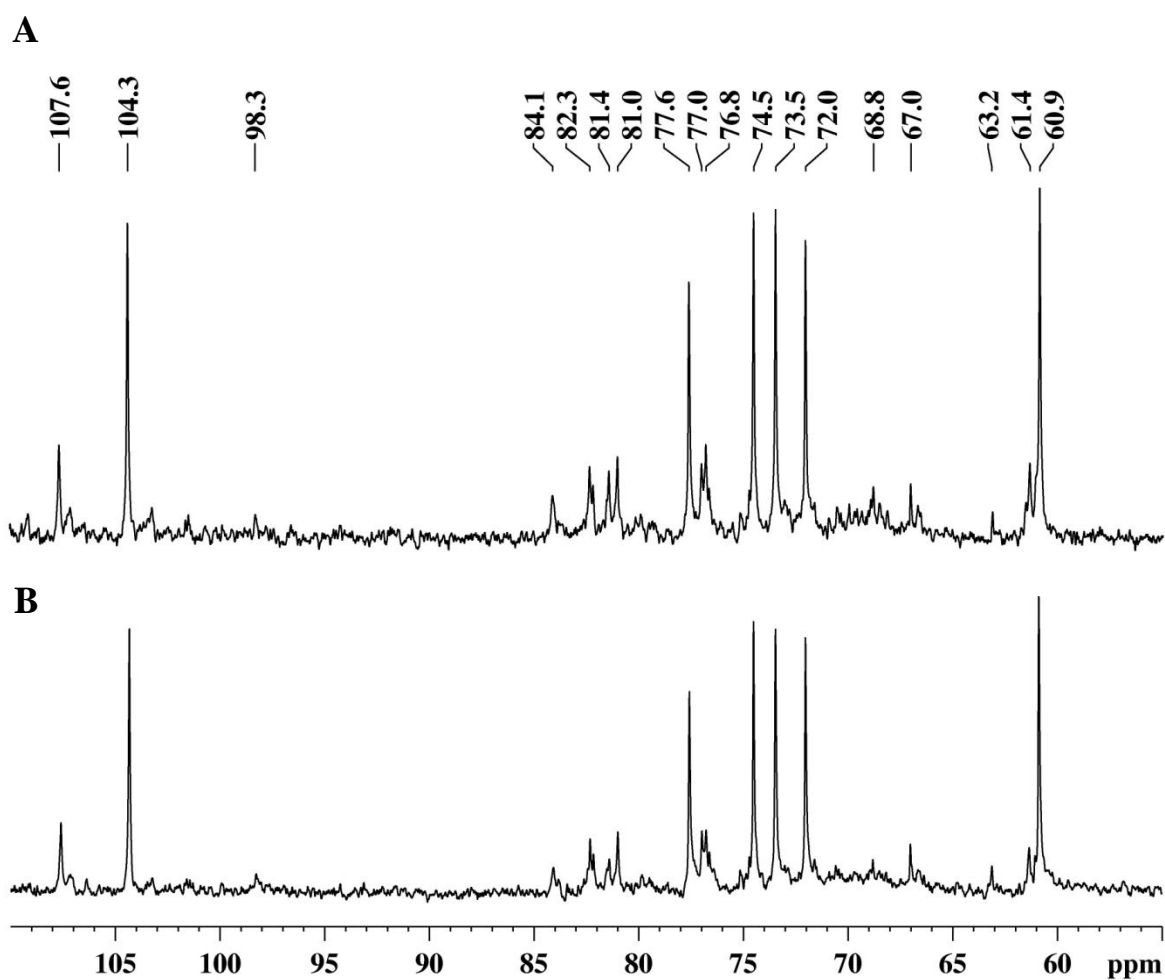


FIGURA 12. ESPECTRO DE RMN-¹³C DE SSF-PWH (A) E SPF-PWH (B) EM D₂O, A 70 °C, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.

Devido às suas características em comum, SSF-PWH e SPF-PWH foram unidas em uma única fração (Figura 8, pg 56). Uma vez que estas frações apresentaram 2 picos distintos de eluição em HPSEC, foi dada continuidade à purificação por meio de filtração em membrana de 100 kDa, originando as frações AGI-100E (eluída) e AGI-100R (retida) (Figura 8). Entretanto, foi verificado por HPSEC que esta membrana não foi suficiente para purificação dos polissacarídeos (Figura 13) e, por este motivo, a fração AGI-100E, foi submetida à filtração em membrana de 50 kDa, conforme fluxograma apresentado na Figura 8 (pg 56).

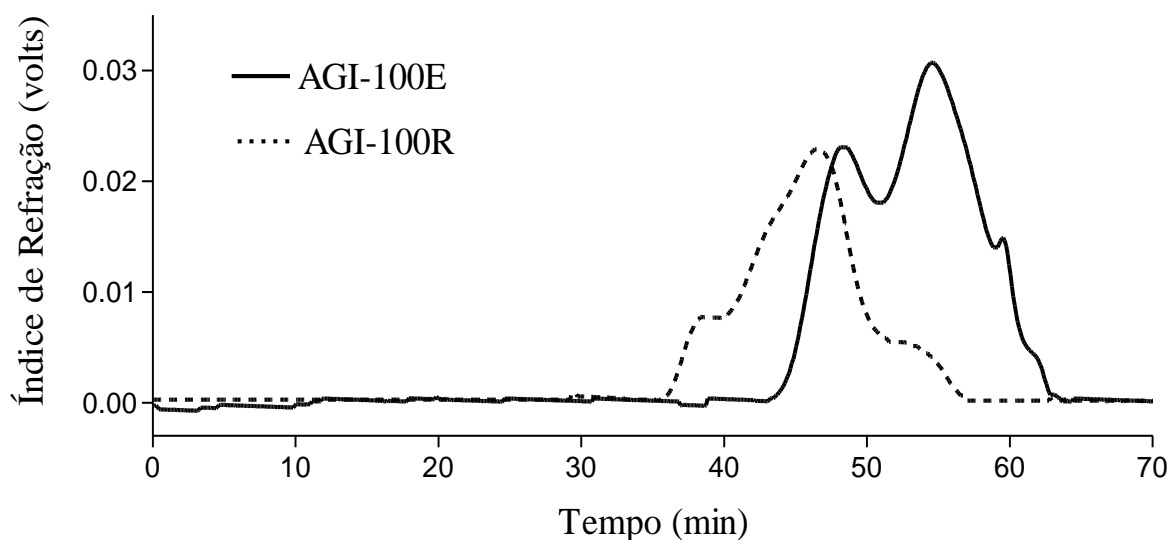


FIGURA 13. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES AGI-100E e AGI-100R, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID).

Esta estratégia foi eficiente, uma vez que produziu duas frações homogêneas (AGI-50R e AGI-50E), o que pode ser observado por seus perfis de eluição em análise de HPSEC, que apresentaram perfil de eluição homogêneo, com a presença de um único pico (Figura 14). Suas massas molares foram de 62 kDa ($dn/dc = 0,168$) e 17 kDa ($dn/dc = 0,164$), respectivamente.

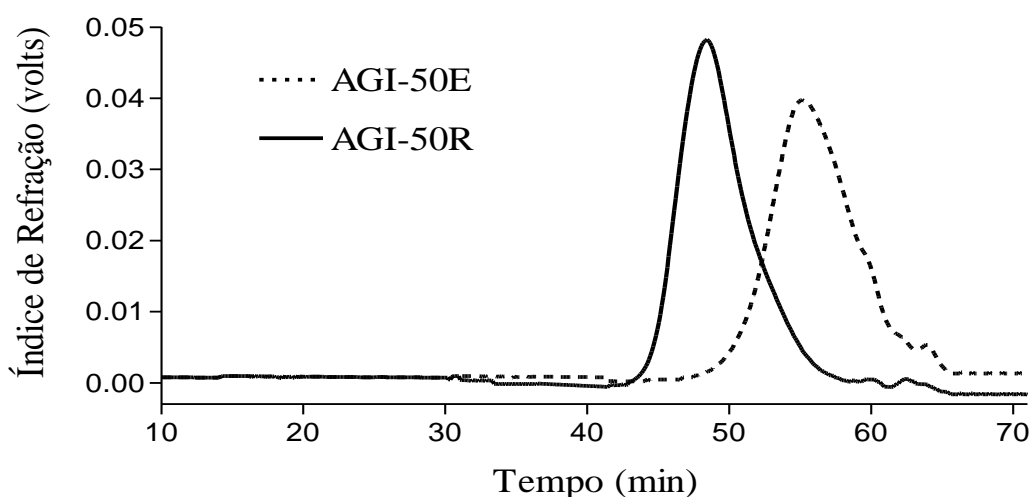


FIGURA 14. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES AGI-50E e AGI-50R, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID).

Devido à presença de ácido urônico, a composição monossacarídica de AGI-50E e AGI-50R foi realizada nas frações nativas e carboxirreduzidas. Dessa forma, frações carboxi-reduzidas apresentaram arabinose, galactose, ramnose e ácido galacturônico na razão molar de 39,6:50,3:5,1:5,0 e 47,8:31,5:10,7:10,0, respectivamente (Tabela 2, pg 52). A presença de ramnose e ácido galacturônico em concentrações similares sugere que a AG-I das frações AGI-50E e AGI-50R pode estar ligada à uma ramnogalacturonana do tipo I (RG-I).

A razão de (Ara+Gal) para Rha é útil para estimar a quantidade relativa das cadeias laterais neutras à cadeia da rhamnogalacturonana. Quanto menor esta razão, menor a quantidade de cadeias laterais ligadas a 4-*O*-Rha da cadeia da RG-I (RENARD e GINIES, 2009). As razões calculadas para as frações AGI-50E e AGI-50R foram de 17,6 e 7,4, respectivamente, demonstrando a fração AGI-50E possui maior quantidade de cadeias neutras de AG-I, se comparada a AGI-50R. Entre estas cadeias neutras, a razão entre arabinose e galactose é uma estimativa da proporção de ramificações de arabinose para a cadeia principal de galactose (RENARD e GINIES, 2009). A fração AGI-50E teve uma razão de 0,8, enquanto que a fração AGI-50R teve razão igual a 1,5, indicando que esta última possui uma AG-I com maiores quantidades de arabinose que a AG-I presente em AGI-50E. Estas estimativas estão em concordância com espectros de RMN-¹³C e análise de metilação. Uma vez que a

fração AGI-50R teve maior quantidade relativa de cadeia principal de ramnagalacturonana que AGI-50E, a mesma apresentou sinais de carbonos anoméricos no RMN- ^{13}C mais intensos em δ 101,4 e δ 98,3, correspondentes a unidades de α -D-GalpA-(1 \rightarrow 4) ligadas e α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2) ligadas, respectivamente (Figura 15).

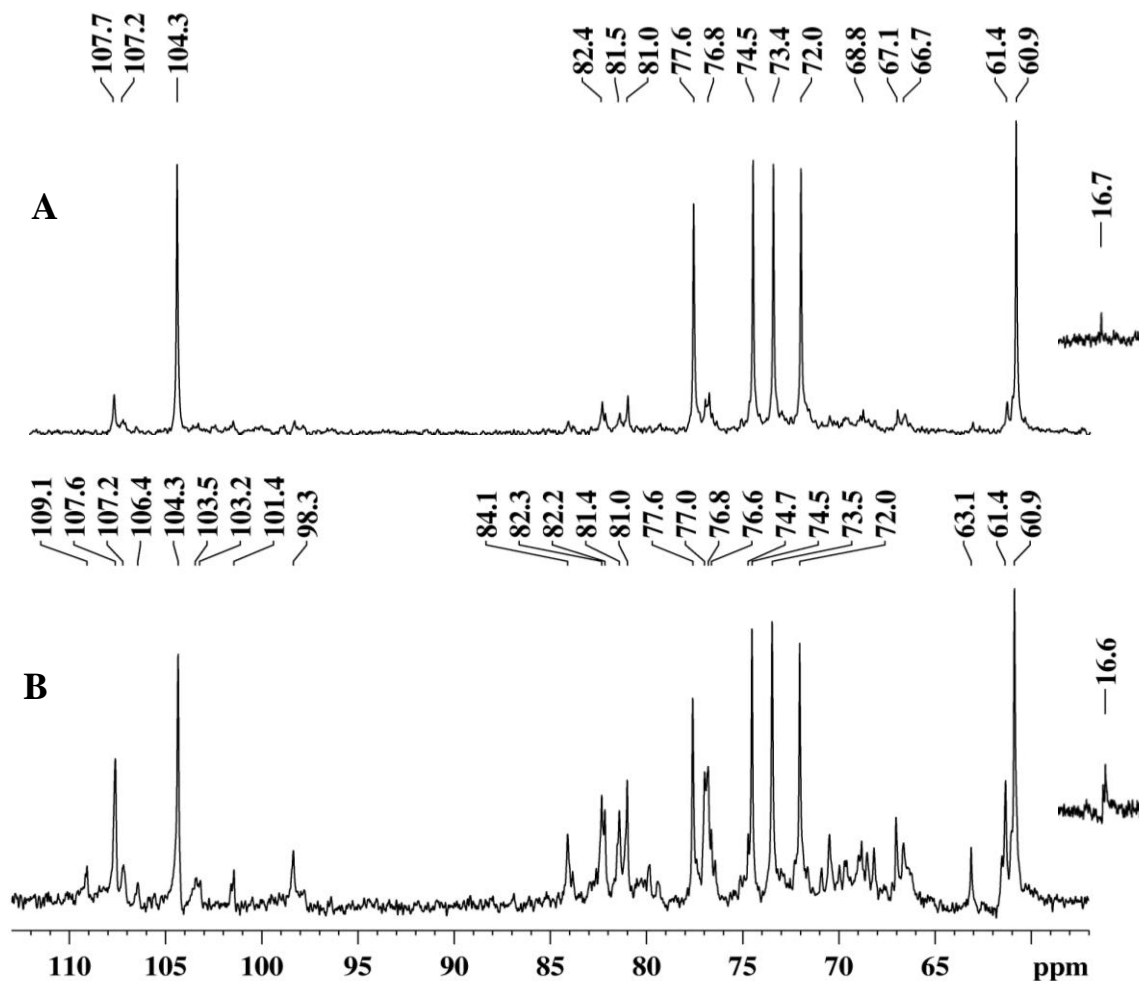


FIGURA 15. ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DE AGI-50E(A) E AGI-50R(B) EM D_2O , A 70 $^{\circ}\text{C}$, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.

A AG-I presente em AGI-50R também possui maiores quantidades de arabinose, se comparada à presente em AGI-50E, e portanto, seu espectro de RMN- ^{13}C (Figura 15) apresentou sinais mais intensos de unidades de α -L-Araf na região de δ 106,4-109,1 correspondendo aos carbonos anoméricos e entre δ 81,0-84,1

correspondendo aos carbonos C-2, C-3 e C-4 do anel (DOURADO *et al.*, 2006; RENARD *et al.*, 1995).

A análise de metilação de AGI-50E e AGI-50R está mostrada na Tabela 3. A fração AGI-50E teve 2,3,6-Me₃-Gal como principal derivado metilado, correspondendo às unidades de Galp (1→4) ligadas da cadeia principal de arabinogalactana do tipo I. Esta cadeia principal apresentou ramificações em O-2, O-3 e O-6, devido à presença dos derivados 3,6-Me₂-, 2,6-Me₂- e 2,3-Me₂-Gal, respectivamente. As cadeias laterais são formadas por uma arabinana (1→5) ligada, que por sua vez apresentou-se ramificada em O-2 e O-3 por unidades de Araf (1→3) ligadas ou por terminais não redutores de Araf.

Com relação à cadeia da ramnogalacturonana, o derivado 3,4-Me₂-Rha demonstrou a presença de unidades de Rhap (1→2) ligadas, enquanto que o derivado 3-Me-Rha indicou a presença de unidades de Rhap 2,4-di-*O*-substituídas, que são os pontos de inserção da AG-I. O tipo de ligação das unidades de ácido galacturônico foi determinado por comparação dos dados de metilação entre a amostra AGI-50E nativa e carboxirreduzida. O aumento observado nos derivados de 2,3,6-Me₃-Gal na análise de metilação da amostra carboxi-reduzida em relação a nativa, indicou que unidades de GalpA (1→4) ligadas estavam presentes. A análise de metilação de AGI-50E também demonstrou a presença de unidades de Galp 6-*O*- e 3,6-di-*O*-substituídas (Tabela 3). Estas são provavelmente provenientes de uma pequena porção de arabinogalactana do tipo II, possivelmente ligadas à cadeia principal da ramnogalacturonana. Entretanto, a ocorrência de variações estruturais de arabinogalactanas têm sido reportadas em literatura recente, como por exemplo, a presença de unidade de β-Galp (1→3) e (1→3,6) ligadas inseridas na cadeia principal de algumas arabinogalactanas do tipo I (HINZ *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2010). Dessa forma, a hipótese de que estas unidades de Galp são elementos estruturais da AG-I encontrada na ameixa seca não pode ser descartada.

TABELA 3. TIPOS DE LIGAÇÃO BASEADOS NA ANÁLISE DE ACETATO DE ALDITÓIS PARCIALMENTE *O*-METILADOS, OBTIDO DAS FRAÇÕES METILADAS AGI-50E E AGI-50R PROVENIENTES DA AMEIXA SECA (*Prunus domestica*)

Acetatos de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados	AGI-50E ^a	AGI-50R ^a	Tipo de ligação ^b
2,3,5-Me ₃ -Ara	8,0	9,0	Araf-(1→
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	7,1	8,8	Galp-(1→
2,5-Me ₂ -Ara	4,0	4,9	→3)-Araf-(1→
2,3-Me ₂ -Ara	18,6	23,2	→5)-Araf-(1→
2-Me-Ara	6,0	6,9	→3,5)-Araf-(1→
3-Me-Ara	3,0	3,8	→2,5)-Araf-(1→
3,4-Me ₂ -Rha	2,7	5,4	→2)-Rhap-(1→
3-Me-Rha	2,4	5,3	→2,4)-Rhap-(1→
2,3,6-Me ₃ -Gal	33,1	11,3	→4)-Galp-(1→
	4,8	9,5	→4)-GalpA-(1→ ^c
2,3,4-Me ₃ -Gal	3,7	4,5	→6)-Galp-(1→
3,6-Me ₂ -Gal	1,5	0,8	→2,4)-Galp-(1→
2,3-Me ₂ -Gal	2,0	1,4	→4,6)-Galp-(1→
2,6-Me ₂ -Gal	2,0	1,8	→3,4)-Galp-(1→
2,4-Me ₂ -Gal	1,1	3,4	→3,6)-Galp-(1→

^a % da área do pico de *O*-metilalditol acetatos relativa à soma das áreas de todos os picos presentes, determinada por GC-MS. Frações foram carboxirreduzidas pelo método de carbodiimida (TAYLOR e CONRAD, 1972), anteriormente a análise de metilação.

^b Baseado em derivados de *O*-metilalditol acetatos.

^c Deduzida pela proporção de GalA e Gal presentes na análise da composição monossacarídica de frações nativas e carboxirreduzidas.

Em relação aos dados de metilação da fração AGI-50R (Tabela 3), estes demonstraram a presença dos mesmos derivados metilados da fração AGI-50E, entretanto, em diferentes proporções. Como citado anteriormente, devido à maior quantidade de RG-I, AGI-50R apresentou maiores porcentagens de 3-Me-Rha, 3,4-Me₂-Rha e 2,3,6-Me₃-Gal (provenientes das unidades de GalpA). Além disso, esta

análise também demonstrou que a AG-I presente na fração AGI-50R possui uma cadeia principal de galactana (1→4) ligada mais curta, devido à presença de menores quantidades de 2,3,6-Me₃-Gal, e mais ramificada, devido as maiores quantidades de derivados metilados de Araf encontradas, que correspondem às cadeias laterais de arabinana.

Arabinogalactanas do tipo I são menos distribuídas em plantas se comparadas àquelas do tipo II. As principais fontes de arabinogalactans do tipo I são sementes, bulbos, folhas e madeira de coníferas (CLARKE *et al.*, 1979). Em frutas, embora o estudo estrutural detalhado de AG-I isolada tenha sido realizado somente para o cajá (*Spondias cytherea*) (IACOMINI *et al.*, 2005), a presença de AG-I também foi sugerida para kiwi (*Actinidia deliciosa*) (REDGWELL *et al.*, 1988), noni (*Morinda citrifolia*) (BUI *et al.*, 2006) e laranja doce (*Citrus sinensis*) (PRABASARI *et al.*, 2011). A presença de AG-I no gênero *Prunus* não foi reportada previamente na literatura. Por outro lado, uma 4-*O*-metil-D-glucurono-D-xilana foi descrita em damasco (*Prunus armeniaca*) (ODONMAZIG e BADGAA, 1990), uma arabinana em sementes de amêndoa (*Prunus dulcis*) (DOURADO *et al.*, 2006) e uma arabinogalactana do tipo II e ácido poligalacturônico no pêssego (*Prunus persica*) (SIMAS-TOSIN *et al.*, 2012).

5.2 EXTRAÇÃO ALCALINA E PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Após as extrações aquosas, os polissacarídeos foram extraídos do resíduo utilizando solução de KOH a 10%, sob refluxo por 2 h, em banho Maria em ebulição. Esta extração resultou, após diálise, em fração denominada PK (20 g), que foi submetida ao processo de fracionamento por congelamento e descongelamento (Figura 16). O sobrenadante (SPK) e precipitado (PPK) resultantes apresentaram rendimento de 8,5 g e 11,3 g, respectivamente (Tabela 4, pg 67).

A fração PPK apresentou como principais monossacarídeos arabinose e glucose (Tabela 4), mas não foi possível realizar análises de RMN-¹³C, pois se apresentou

insolúvel em água, NaOH 10% e dimetilsulfóxido, e por este motivo não foi dada sequência à sua purificação.

Por outro lado, SPK apresentou como principais monossacarídeos arabinose, galactose, xilose e glucose (Tabela 4). Pelo espectro de RMN- ^{13}C de SPK, pode-se observar a presença de arabinogalactanas do tipo I devido aos sinais de β -D-galactose piranosídica em δ 104,3 (C-1), δ 74,5 (C-5), δ 73,5 (C-3), δ 72,1 (C-2) e δ 77,6 (C-4 substituído) (DELGOBO *et al.*, 1999; GORIN e MAZUREK, 1975; TISCHER, GORIN, *et al.*, 2002). O sinal em δ 107,6 indica a presença de α -L-Araf (DELGOBO *et al.*, 1999) (Figura 17).

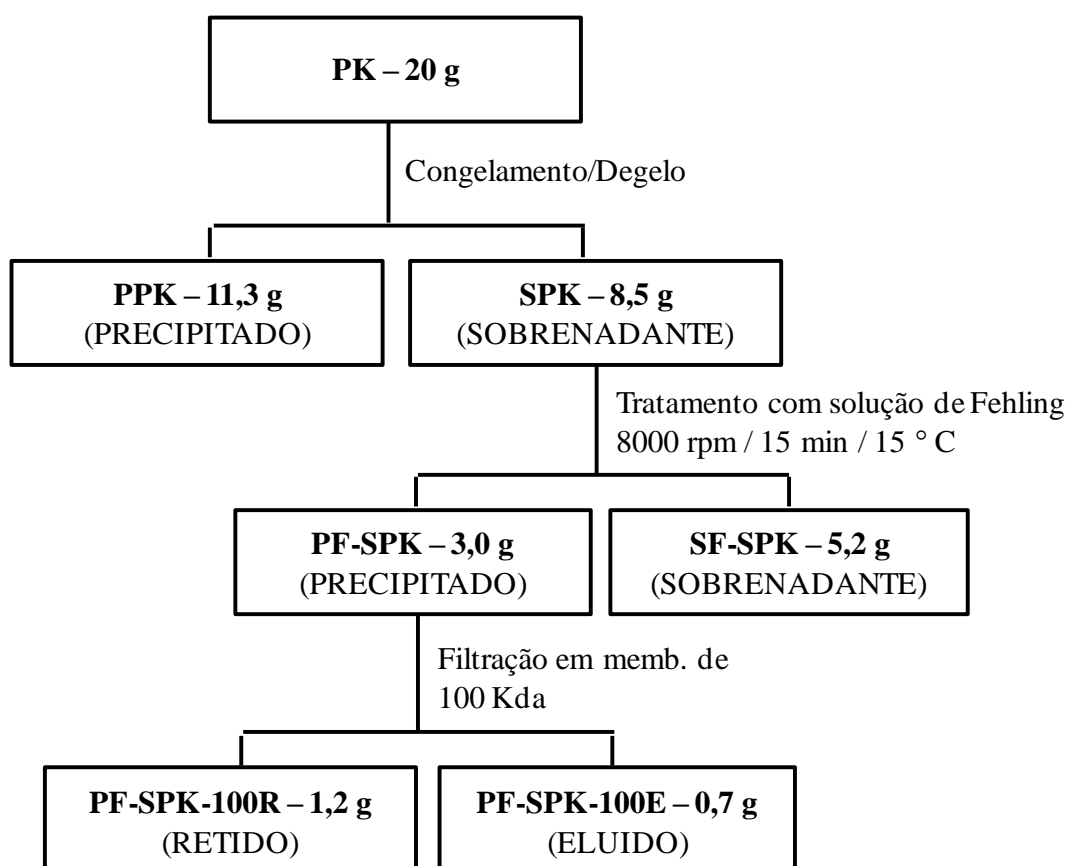


FIGURA 16. FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO ALCALINA DA AMEIXA SECA (*Prunus domestica*).

TABELA 4. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DA EXTRAÇÃO ALCALINA DA AMEIXA SECA (*Prunus domestica*)

Frações	Rendimentos ⁽¹⁾		Monossacarídeos (%)						
	g	%	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Gal	Glc	Ácidos Urônicos ⁽²⁾
PPK	11,3	0,8	-	-	66,9	6,9	5,8	18,5	1,9
SPK	8,5	0,6	2,5	2,7	34,7	10,0	25,8	17,3	6,8
SF-SPK	5,2	0,4	1,5	-	45,7	4,8	37,1	4,5	6,8
PF-SPK	3,0	0,2	-	2,3	17,3	33,1	16,3	24,9	5,9
PF-SPK-100E	0,7	0,05	-	2,4	20,4	31,5	19,3	17,8	n.d.
PF-SPK-100R	1,2	0,15	-	3,5	12,7	34,0	11,2	38,6	n.d.

NOTAS: Análise de acetatos de alditóis por GC-MS. (1) Partindo de 1446 g de polpa seca; (2) determinações de ácidos urônicos segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Rha (ramnose); Fuc (fucose); Ara (arabinose); Xyl (xilose); Man (manose); Gal (galactose); Glc (glucose); n.d. (não determinado).

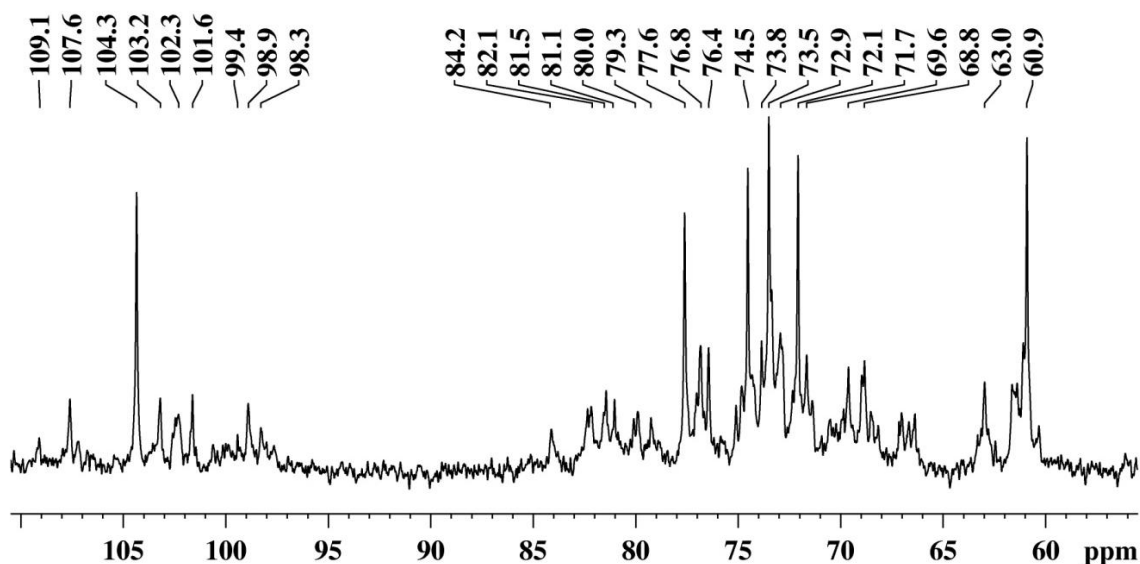


FIGURA 17. ESPECTRO DE RMN-¹³C DE SPK, EM D₂O, A 70 °C, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.

Entretanto, além dos sinais de AG-I, SPK apresentou uma diversidade de sinais de carbonos anoméricos na região entre δ 98 e δ 104 (Figura 17), além de conteúdo significativo de xilose e glucose de acordo com a composição monossacarídica (Tabela 4). Indicando possuir, além da arabinogalactana do tipo I, polissacarídeos contendo xilose. Quando analisada em HPSEC, SPK apresentou perfil heterogêneo de eluição, conforme Figura 18.

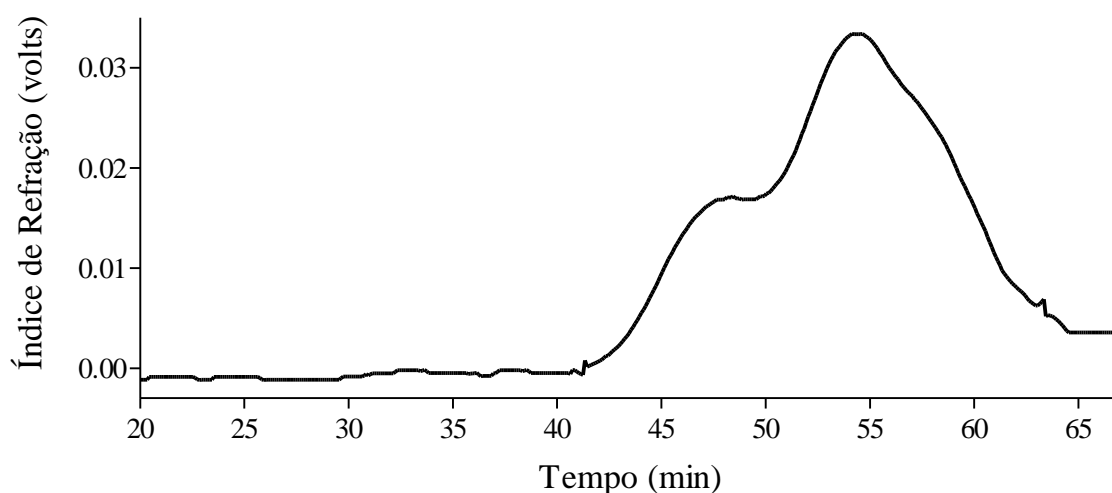


FIGURA 18. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO SPK, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID).

Uma vez que a fração SPK apresentava uma mistura de polissacarídeos, para separação de seus polissacarídeos, foi realizado tratamento com solução de Fehling. O tratamento de Fehling resultou, desta maneira, em duas frações denominadas PF-SPK (precipitada) e SF-SPK (sobrenadante) (Figura 16, pg 66).

A análise de HPSEC das frações SF-SPK e PF-SPK está demonstrada na Figura 19 e indica que ambas as frações permaneceram heterogêneas após o tratamento com solução de Fehling.

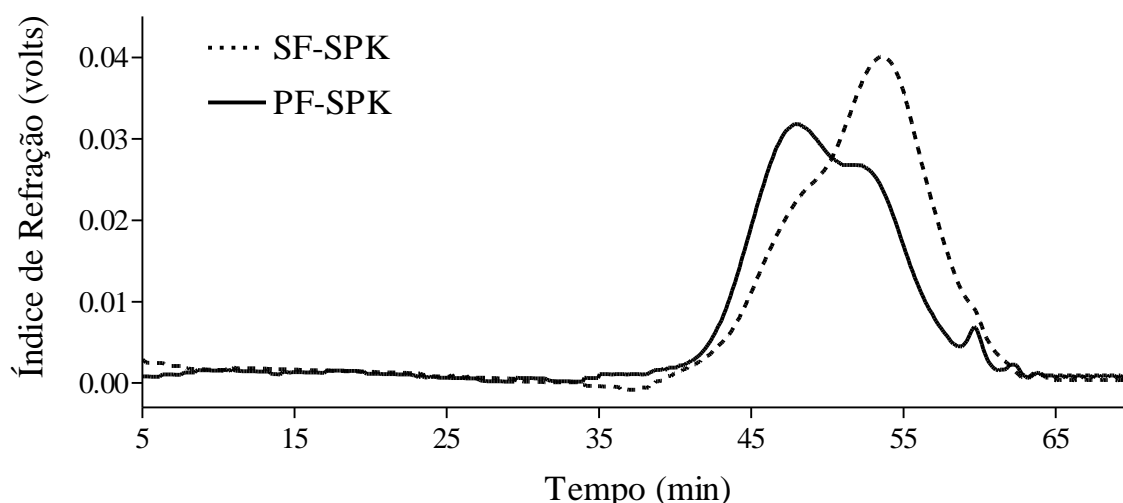


FIGURA 19. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES SF-SPK E PF-SPK, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID).

A análise de composição monossacarídica de SF-SPK indicou a presença de galactose e arabinose como principais monossacarídeos da fração, representando 45,7% e 37,1% do conteúdo total de açúcares, respectivamente (Tabela 4, pg 67). Da mesma forma, seu espectro de RMN-¹³C (Figura 20A) apresentou os sinais principais referentes à arabinose e galactose, que unidos às análises de composição monossacarídica indicam a presença de arabinogalactana do tipo I, como encontrado nas frações aquosas AGI-50E e AGI-50R.

Com relação ao precipitado de Fehling, PF-SPK, os principais monossacarídeos encontrados foram glucose e xilose, que representaram 24,9% e 33,1% do total de açúcares, respectivamente (Tabela 4, pg 67). O espectro de RMN-¹³C de PF-SPK (Figura 20B) apresentou sinais anoméricos de β -glucose em δ 102,3 e sinais de α -xilose em δ 99,4 e δ 98,9 (BUSATO *et al.*, 2001), que estão em concordância com a composição monossacarídica. Estes dados indicam que, enquanto a AG-I presente na fração SPK permaneceu solúvel após o tratamento de Fehling (fração SF-SPK), a fração contendo xilose e glucose foi precipitada (fração PF-SPK).

Uma vez que PF-SPK ainda possuía perfil heterogêneo de eluição de acordo com análise de HPSEC (Figura 19), foi dada sequência a sua purificação por meio de filtração em membrana de 100 kDa, conforme fluxograma apresentado na Figura 16 (pg 66). A análise de homogeneidade das frações resultantes, PF-SPK-100E e PF-

SPK-100R está apresentada na Figura 21. O perfil de eluição em HPSEC de PF-SPK-100E apresentou dois picos, enquanto que PF-SPK-100R apresentou apenas um pico com alto grau de polidispersão.

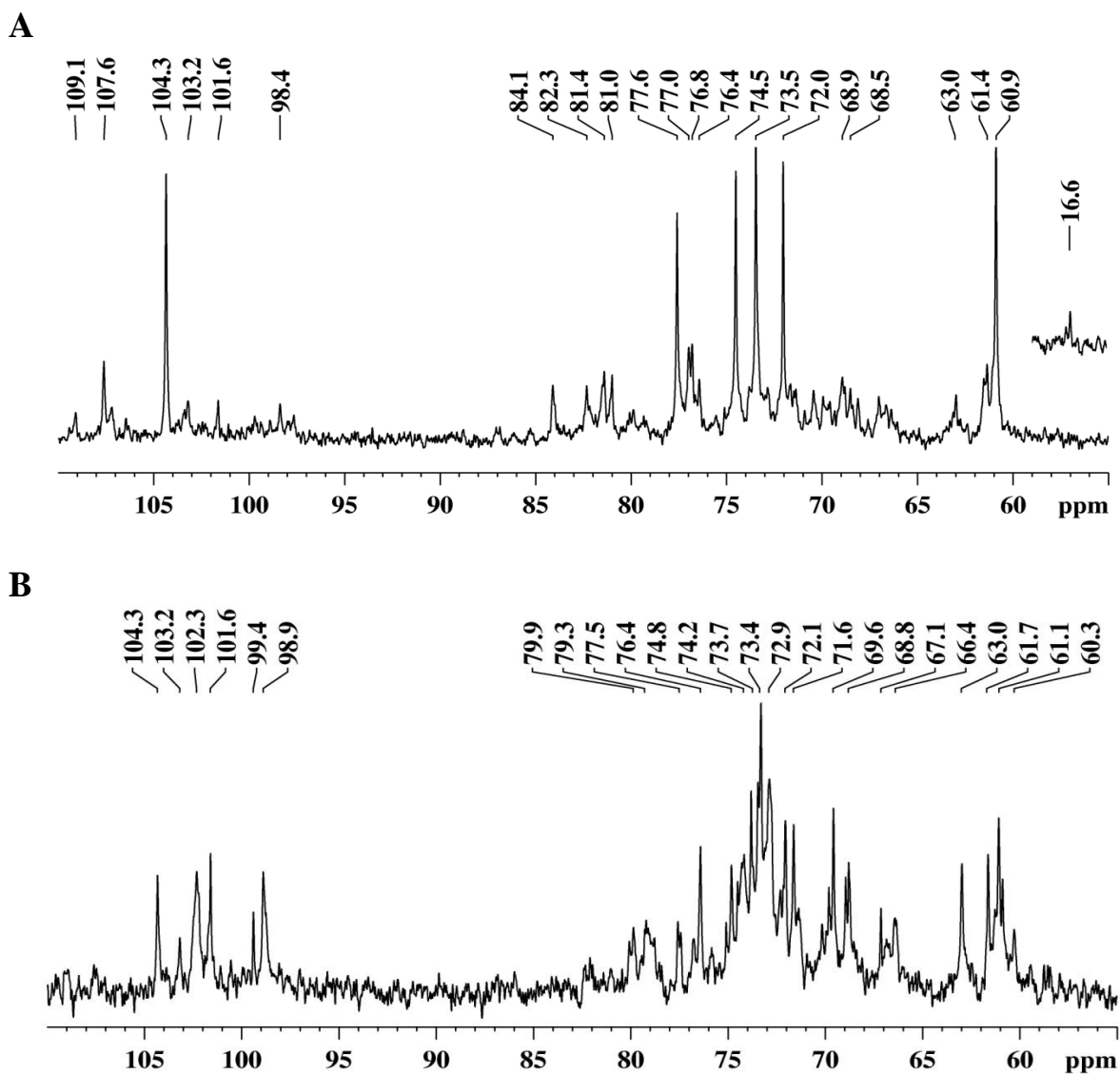


FIGURA 20. ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DE SF-SPK (A) E PF-SPK (B), EM D_2O , A 70 °C, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.

A composição monossacarídica da fração PF-SPK-100R apresentou glucose e xilose como principais açúcares, seguidos de galactose, arabinose e fucose (Tabela 4, pg 67). Os dados de metilação da fração PF-SPK-100R estão apresentados na Tabela 5.

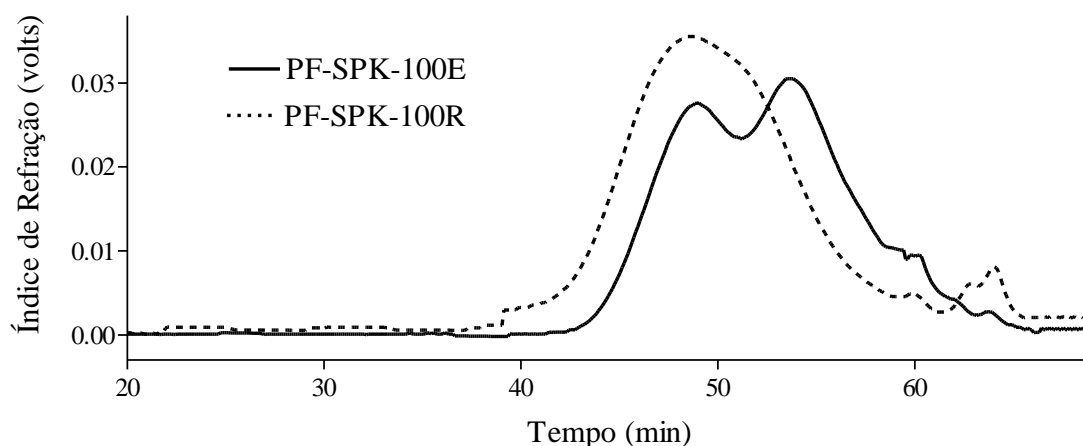


FIGURA 21. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID) DAS FRAÇÕES PF-SPK-100E E PF-SPK-100R

TABELA 5. TIPOS DE LIGAÇÃO BASEADOS NA ANÁLISE DE ACETATO DE ALDITÓIS PARCIALMENTE *O*-METILADOS, OBTIDO DA FRAÇÃO METILADA PF-

Acetato de alditóis parcialmente <i>O</i> -metilados	PF-SPK-100R	Tipo de ligação ^c
2,3,5-Me ₃ -Ara	6,5	Araf-(1→
2,3,4-Me ₃ -Ara	5,2	Arap-(1→
2,3,4-Me ₃ -Xyl +	10,5	Xylp-(1→
2,3,4-Me ₃ -Fuc ^a	3,5	Fucp-(1→
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	9,5	Galp-(1→
3,4-Me ₂ -Xyl +	6,5	→2)-Xylp-(1→
2,3-Me ₂ -Xyl ^b	9	→4)-Xylp-(1→
3-Me-Xyl	10,0	→2,4)-Xylp-(1→
2,3,4-Me ₃ -Gal	2,7	→6)-Galp-(1→
2,3,6-Me ₃ -Glc	15,0	→4)-Glc p-(1→
2,3-Me ₂ -Glc	21,6	→4,6)-Glc p-(1→

SPK-100R PROVENIENTES DA AMEIXA SECA (*Prunus domestica*)

^a A diferença entre proporções dos derivados 2,3,4-Me₃-Fuc e 2,3,4-Me₃-Xyl foi calculada com base na proporção de fucose indicada pela composição monossacarídica.

^b A diferença entre proporções dos derivados 3,4-Me₂-Xyl e 2,3-Me₂-Xyl foi calculada com base na intensidade dos fragmentos específicos gerados nos seus respectivos espectros de massas.

^c Baseado no tipo dos derivados de *O*-metilalditol acetatos.

O derivado metilado 2,3,6-Me₃-Glc corresponde à cadeia principal formada por unidades de glucose piranosídica (1→4) ligadas. Estas possuem substituições em O-6, conforme indicado pela presença do derivado metilado 2,3-Me₂-Glc. Como cadeias laterais, foram encontradas unidades de xilose terminal, 2-*O*, 4-*O* e 2,4-di-*O*-substituídas, de acordo com os derivados metilados 2,3,4-Me₃-, 3,4-Me₂-, 2,3-Me₂ e 3-Me-Xyl, respectivamente. Os derivados 3,4-Me₂-xilitol acetato e 2,3-Me₂-xilitol acetato possuem o mesmo tempo de retenção nas condições de GC-MS empregadas, mas quando deuterados no C-1, cada componente do mesmo pico pode ser detectado por seu padrão de fragmentação de massas diferenciado. O derivado 3,4-Me₂-xilitol acetato origina íons de m/z 190, 130, 117 e 88, enquanto que o derivado 2,3-Me₂-xilitol acetato origina íons com m/z de 189, 129, 118 e 87 (BUSATO *et al.*, 2005). A partir da intensidade de cada íon foi verificada uma proporção de 3,4-Me₂-Xylp e 2,3-Me₂-Xylp de 1,0:1,4, indicando que as unidades de xilose estão majoritariamente (1→4) ligadas (Figura 22). Este tipo de ligação é pouco comum em xiloglucanas, uma vez que normalmente unidades de xilose encontram-se ligadas exclusivamente em O-2. Em xiloglucanas de plantas, a ligação (1→4) entre unidades de xilose foi reportada anteriormente apenas em folhas de *Hymenaea courbaril* (BUSATO *et al.*, 2005). A presença de unidades de xilose 2,4-di-*O*-substituídas também não foi reportada previamente em xiloglucanas de dicotiledôneas, apenas em musgos e monilófitas (HSIEH e HARRIS, 2012).

Além de glucose e xilose, foram encontrados os derivados metilados 2,3,4,6-Me₃-Gal e 2,3,4-Me₃-Gal, referentes a unidades de Galp terminal e 6-*O*-substituída. Embora a presença de galactose terminal seja característica comum em xiloglucanas, unidades de Galp (1→6) ligadas não foram identificadas anteriormente em dicotiledôneas, apenas no musgo *Physcomitrella patens* (PEÑA *et al.*, 2008).

Outros açúcares presentes foram Fucp, Arap, Araf terminais, conforme derivados metilados 2,3,4-Me₃-Fuc, 2,3,4-Me₃-Ara e 2,3,5-Me₃-Ara, respectivamente. Unidades terminais de fucose são comumente encontrados em xiloglucanas de dicotiledôneas (HAYASHI, 1989). Por outro lado, ao invés de fucose, unidades de Araf foram identificadas em cadeias laterais de xiloglucanas de plantas solanáceas e mais recentemente em xiloglucanas de azeitonas (*Olea europaea*) (VIERHUIS *et al.*,

2001; YORK *et al.*, 1996). Apesar disto, a presença concomitante de unidades de fucose e arabinose é uma característica incomum, e foi identificada anteriormente apenas em xiloglucanas de *Nerium oleander* (HOFFMAN *et al.*, 2005). Cabe ressaltar ainda que a forma piranosídica de arabinose encontrada na fração PF-SPK-100R, conforme o derivado metilado 2,3,4-Me₃-Ara, não foi reportada anteriormente em xiloglucanas de dicotiledôneas.

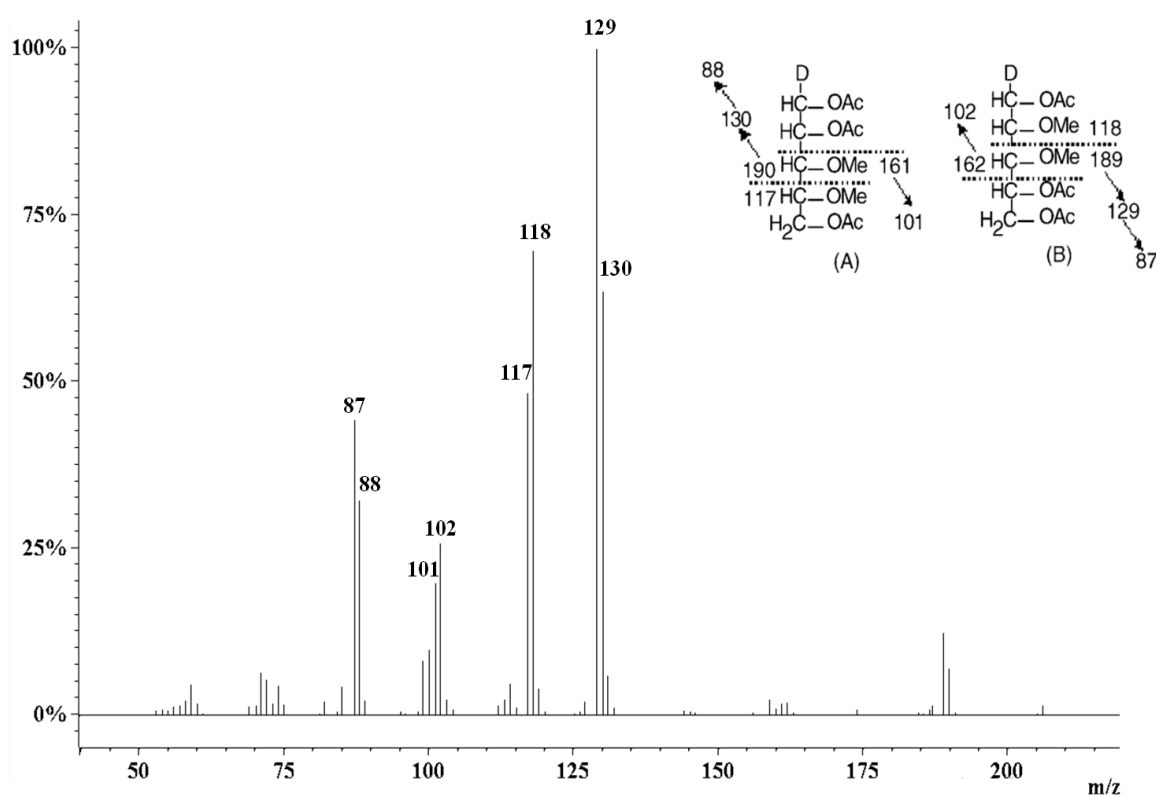


FIGURA 22. FRAGMENTAÇÃO DA MISTURA DOS ACETATOS DE 2,3- E 3,4-Me₂-XILITOIS DEUTERADOS NO C-1. Insetos: fragmentos dos derivados (A) 3,4-Me₂-Xyl e (B) 2,3-Me₂-Xyl.

O espectro de RMN-¹³C de PF-SPK-100R (Figura 23) contém uma diversidade de sinais na região anomérica, confirmando a complexidade estrutural da xiloglucana presente na fração. Os sinais referentes às unidades de β-Glucp (1→4) e (1,4→6) ligadas que constituem a cadeia principal são encontrados em δ 102,3, e δ 103,2, respectivamente (BUSATO *et al.*, 2001; HANTUS *et al.*, 1997). Os sinais em δ 99,4, δ 98,9 e δ 101,6 foram atribuídos às unidades de α-xilose terminal e ligada em O-2 e O-

2,4, respectivamente, que compõe as cadeias laterais (BUSATO *et al.*, 2001; HANNUKSELA e PENHOAT, 2004). Além destes, o sinal em δ 104,4 pode ser atribuído às unidades de β -galactose terminal, enquanto que as unidades ligadas em O-6 não foram visualizadas devido à baixa concentração, ou ainda porque o sinal poderia estar sobreposto às unidades de galactose terminal (WANG *et al.*, 2005). O sinal anomérico das unidades de Araf terminal é observado em δ 107,6 enquanto que o sinal do C-6 das unidades de Fucp terminal em δ 15,8.

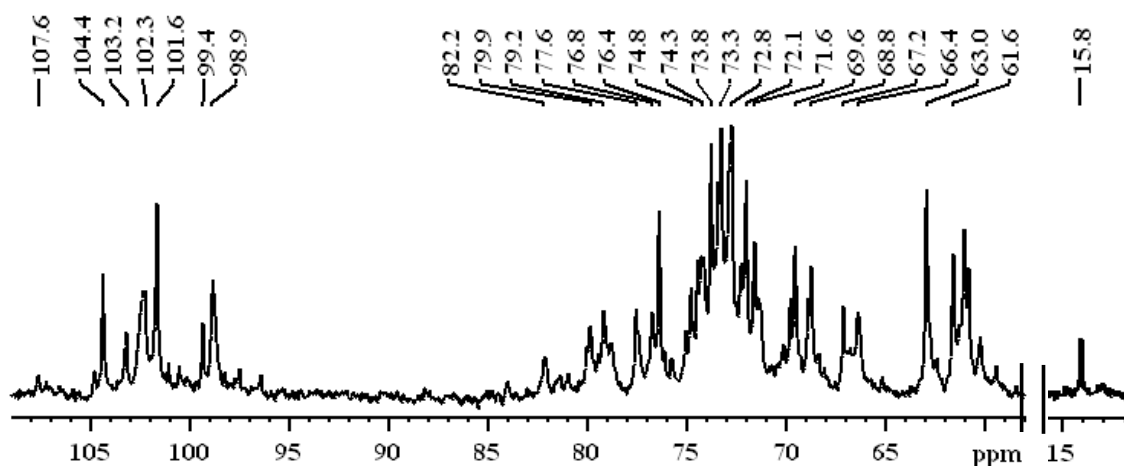


FIGURA 23. ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DE PF-SPK-100R (EM D $_2$ O), A 70 °C, COM OS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) EXPRESSOS EM PPM.

Por se tratar de um polissacarídeo com características estruturais complexas e pouco comuns, um estudo detalhado dos oligossacarídeos produzidos por hidrólise com celulase [endo-(1 \rightarrow 4)- β -glucanase] ou ainda com endo-(1 \rightarrow 4)- β -glucanase xiloglucana-específica, deverá ser conduzido futuramente para completa elucidação estrutural desta fração.

5.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA FRAÇÃO PWH

5.2.1 Atividade antiúlcera

Para investigar se polissacarídeos da ameixa seca apresentavam efeito gastroprotetor, o extrato bruto obtido por extração aquosa a quente (fração PWH), foi testado quanto à sua atividade antiúlcera. A lesão gástrica aguda induzida por etanol em ratos tem sido comumente utilizada para mensurar propriedades protetoras de lesão de mucosa de novos agentes. A lesão gástrica induzida por etanol é associada à sua capacidade de dissolver a camada de muco gástrico, assim como estimular a secreção de histamina, pepsina e íons H^+ , e é caracterizada por áreas de hemorragia marcadas e difusas no estômago, como previamente reportada por Szabo (1987). Assim sendo, foi avaliado se o tratamento com a fração PWH poderia proteger a mucosa neste modelo. Os resultados demonstraram que a administração oral de omeprazol (40 mg/kg) e PWH em doses de 3 e 10 mg/kg, 1 h antes da indução de lesões gástricas com etanol P.A., resultou em redução significativa da área lesionada em $80 \pm 3\%$, $67 \pm 11\%$ e $60 \pm 12\%$, respectivamente, se comparada ao grupo controle tratado apenas com veículo (Figura 24A e B). Além disso, os grupos que receberam 3 e 10 mg/kg de PWH não apresentaram diferença significativa entre si. Dessa forma, PWH demonstrou possuir atividade gastroprotetora nas concentrações de 3 e 10 mg/kg, prevenindo formação de lesões agudas causadas por administração de etanol. Este resultado é superior ao encontrado no bagaço da cana de açúcar, onde polissacarídeos contendo arabinoxilanas foram capazes de reduzir a área de lesão gástrica em 50% utilizando o mesmo modelo de indução de úlcera gástrica (MELLINGER-SILVA *et al.*, 2011).

Embora mais estudos sejam necessários para elucidar o mecanismo de ação gastroprotetora de PWH, sugere-se que seu efeito seja devido a habilidade dos seus polissacarídeos em: (I) se ligar à superfície da mucosa e atuar como um revestimento protetor da mesma; (II) diminuir atividades secretórias de ácido e pepsina; e (III) proteger a mucosa por aumentar a síntese de muco e/ou sequestrar radicais livres (MELLINGER-SILVA *et al.*, 2011; NERGARD *et al.*, 2005; YAMADA, 1994).

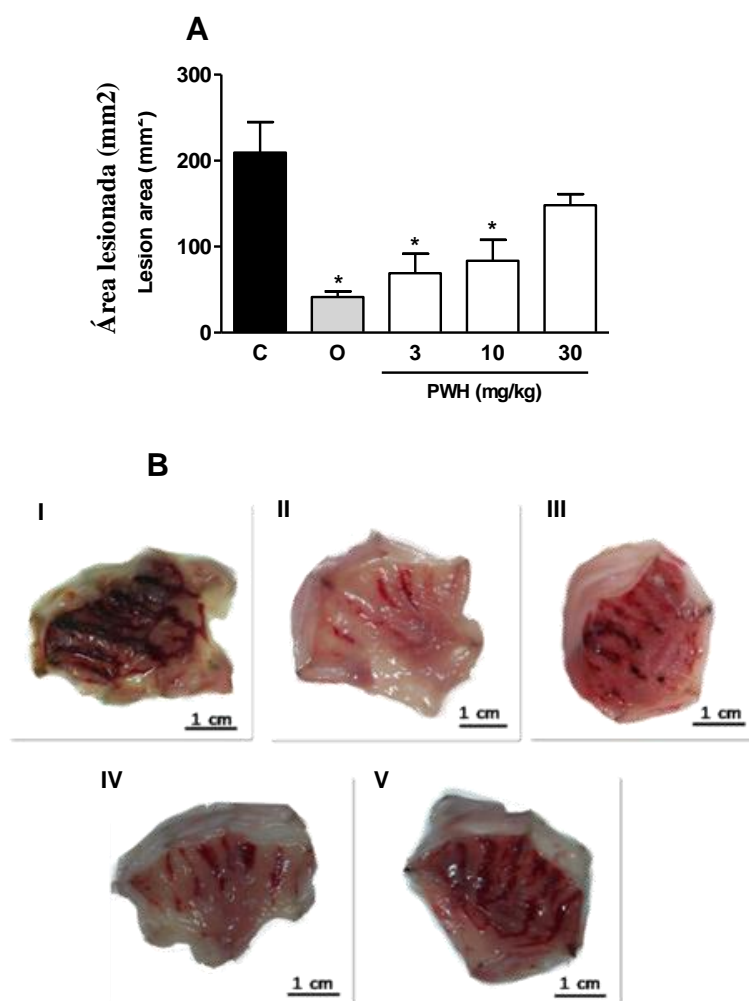


FIGURA 24. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PWH (3, 10 E 30 mg/kg) CONTRA LESÕES GÁSTRICAS AGUDAS (C: CONTROLE, ÁGUA 0,1 mL/100 g; O: OMEPRAZOL 40 mg/kg). Painele A mostra áreas de úlcera gástrica (mm²) e painele B mostra fotografias macroscópicas do grupo controle (I), omeprazol (II), PWH 3 mg/kg (III), PWH 10 mg/kg (IV) e PWH 30 mg/kg (V). Os resultados estão expressos como mediana \pm EPM (n=6) e a comparação estatística foi realizada usando análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Barras = 1 cm (I-V).

6 CONCLUSÕES

Após análise dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- A partir da extração aquosa, foram isoladas duas ramnogalacturonanas do tipo I com inserções de arabinogalactanas do tipo I em AGI-50E e AGI-50R, com massas molares de 17 e 62 kDa, respectivamente. AGI-50E e AGI-50R diferiram quanto à proporção da cadeia principal de ramnogalacturonana, tamanho da cadeia de β -galactanas (1 \rightarrow 4) ligadas e na proporção das cadeias lateral de arabinanas. Além de arabinogalactanas do tipo I, a presença de homogalacturonanas parcialmente metil- e acetilesterificadas foi verificada no extrato aquoso (PWH);

- A partir da extração alcalina, foi obtido um polissacarídeo que contém principalmente fucose, arabinose, xilose, galactose e glucose em uma razão molar de 3,5:12,7:34,0:11,2:38,6. A partir dos dados de RMN- ^{13}C e análise de metilação, o polissacarídeo em questão foi identificado como uma xiloglucana, com características estruturais pouco comuns, e, por esse motivo, novos estudos deverão ser conduzidos futuramente para completa elucidação estrutural desta xiloglucana;

- Por fim, a atividade gastroprotetora contra lesões gástricas agudas induzidas por etanol em ratos, foi avaliada para o extrato bruto aquoso (fração PWH). A administração oral de PWH nas doses de 3 e 10 mg/kg reduziu a área da lesão gástrica em $67 \pm 11\%$ e $60 \pm 12\%$, respectivamente. Estes resultados sugerem que polissacarídeos presentes em ameixas secas apresentam atividade protetora antiúlcera gástrica.

REFERÊNCIAS

- ABOUGHE-ANGONE, S.; NGUEMA-ONA, E.; GHOSH, P.; LEROUGE, P.; ISHII, T.; RAY, B.; DRIOUICH, A. Cell wall carbohydrates from fruit pulp of *Argania spinosa*: structural analysis of pectin and xyloglucan polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 1, p. 67-72, 2008.
- AHLMAN, H.; NILSSON, O. The gut as the largest endocrine organ in the body. **Annals of Oncology**, v. 12, n. suppl 2, p. S63-S68, 2001.
- AHMED, T.; SADIA, H.; BATOOL, S.; JANJUA, A.; SHUJA, F. Use of prunes as a control of hypertension. **Journal of Ayub Medical College**, v. 22, n. 1, p. 28-31, 2010.
- AHMED, T.; SADIA, H.; KHALID, A.; BATOOL, S.; JANJUA, A. Report: prunes and liver function: a clinical trial. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 4, p. 463-6, 2010.
- ALLEN, A. **Gastrointestinal mucus**. Bethesda: Am. Physiol. Soc, 1989.
- ALLEN, A.; HOSKINS, L. C. **Colonic mucus in health and disease**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1988. 65-94.
- ASGAR, M. A.; YAMAUCHI, R.; KATO, K. Structural features of pectins from fresh and sun-dried Japanese persimmon fruit. **Food Chemistry**, v. 87, n. 2, p. 247-251, 2004.
- ASPINALL, G. O. Gums and mucilages. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 24, p. 333-79, 1969.
- AVIGAD, G.; DEY, P. M. **Plant Biochemistry**. New York: Academic Press, 1997.
- BAATAR, D.; KAWANAKA, H.; SZABO, I. L.; PAI, R.; JONES, M. K.; KITANO, S.; TARNAWSKI, A. S. Esophageal ulceration activates genes encoding keratinocyte growth factor and its receptor in rats: a key to esophageal ulcer healing? **Gastroenterology**, v. 122, p. 458-468, 2002.
- BASAK, R. K.; MANDAL, P. K.; MUKHERJEE, A. K. Studies on a neutral polysaccharide isolated from bael (*Aegle marmelos*) fruit pulp. **Carbohydrate Research**, v. 97, n. 2, p. 315-321, 1981.
- BE MILLER, J. **Starch-based gums**. San Diego: Academic Press, 1993.
- BLAŽEK, J. A survey of the genetic resources used in plum breeding. **Acta Horticulturae**, v. 734, p. 31-45, 2007.
- BOCK, K.; PEDERSEN, C. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 41, p. 27-66, 1983.

BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and Biochemistry of Plant cell Walls**. London: 1990.

BRUMMELL, D. A.; DAL CIN, V.; CRISOSTO, C. H.; LABAVITCH, J. M. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 405, p. 2029-2039, 2004.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. United States of America: Mc Graw-Hill Companies, 2006.

BUCKERIDGE, M. S. Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. **Plant Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1017-1023, 2010.

BUI, A. K.; BACIC, A.; PETTOLINO, F. Polysaccharide composition of the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni). **Phytochemistry**, v. 67, n. 12, p. 1271-5, 2006.

BUSATO, A. P.; VARGAS-RECHIA, C. G.; GORIN, P. A. J.; PETKOWICZ, C. L.; TISCHER, C. A.; BOCHICCHIO, R.; REICHER, F. New 4-*O*-substituted xylosyl units in the xyloglucan from leaves of *Hymenaea courbaril*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 35, n. 5, p. 277-282, 2005.

BUSATO, A. P.; VARGAS-RECHIA, C. G.; REICHER, F. Xyloglucan from the leaves of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 3, p. 525-31, 2001.

CAPEK, P. An arabinogalactan containing 3-*O*-methyl-D-galactose residues isolated from the aerial parts of *Salvia officinalis* L. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 8, p. 1390-1393, 2008.

CARPITA, N.; MCCANN, M. The cell wall. In: BUCHAMAN, B. B.; WILHELM, G., *et al* (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville American Society of Plant Physiologists, 2000. p.52-108.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-30, 1993.

CHO, Y. J.; HWANG, J. K. Modeling the yield and intrinsic viscosity of pectin in acidic solubilization of apple pomace. **Journal of Food Engineering**, v. 44, n. 2, p. 85-89, 2000.

CHOI, E. Y.; HWANG, H. J.; KIM, I. H.; NAM, T. J. Protective effects of a polysaccharide from *Hizikia fusiformis* against ethanol toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 134-139, 2009.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; BERTOLINI, M. L. C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 687-690, 2009.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; DE SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A

polysaccharide from a tea (infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 7, p. 1018-1021, 2006.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; DE SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Acidic heteroxylans from medicinal plants and their anti-ulcer activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 2, p. 274-278, 2008.

CLARKE, A.; ANDERSON, R.; STONE, B. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. **Phytochemistry**, v. 18, n. 4, p. 521-540, 1979.

COIMBRA, M. A.; MAFRA, I.; FERREIRA, D.; CARDOSO, S.; DOMINGUES, M. R.; NUNES, F. M.; BARROS, A.; DELGADILLO, I. **Estrutura de Polissacarídeos - Os polissacarídeos das paredes celulares dos frutos e as propriedades que estes conferem aos alimentos**. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2004. 591-596.

COLLINS, P. M.; FERRIER, R. J. **Monosaccharides**: their chemistry and their role in natural products. Chichester: J. Wiley, 1995. 547.

CORDEIRO, L.; REINHARDT, V. F.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P.; BURCI, L. M.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Arabinan and arabinan-rich pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds: Structure and gastroprotective activity. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 937-944, 2012.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005.

DE VRIES, J. A. **Repeating units in the structure of pectin**. Oxford: IRL Press, 1988.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudate: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharide. **Carbohydrate Research**, v. 320, n. 3, p. 167-175, 1999.

DING, M.; KINOSHITA, Y.; KISHI, K.; NAKATA, H.; HASSAN, S.; KAWANAMI, C.; SUGIMOTO, Y.; KATSUYAMA, M.; NEGISHI, M.; NARUMIYA, S. Distribution of prostaglandin E receptors in the rat gastrointestinal tract. **Prostaglandins**, v. 53, n. 3, p. 199-216, 1997.

DOCO, T.; WILLIAMS, P.; PAULY, M.; O'NEILL, M. A.; PELLERIN, P. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 3, p. 253-261, 2003.

DONG, C. X.; HAYASHI, K.; MIZUKOSHI, Y.; LEE, J. B.; HAYASHI, T. Structures and anti-HSV-2 activities of neutral polysaccharides from an edible plant, *Basella rubra* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 245-249, 2012.

DONG, M. H.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense. **Current opinion in gastroenterology**, v. 22, n. 6, p. 599-606, 2006.

DONG, Q.; FANG, J. N. Structural elucidation of a new arabinogalactan from the leaves of *Nerium indicum*. **Carbohydrate Research**, v. 332, n. 1, p. 109-114, 2001.

DONG, Q.; YAO, J.; FANG, J. N.; DING, K. Structural characterization and immunological activity of two cold-water extractable polysaccharides from *Cistanche deserticola* Y. C. Ma. **Carbohydr Research**, v. 342, n. 10, p. 1343-9, 2007.

DOURADO, F.; CARDOSO, S. M.; SILVA, A.; GAMA, F. M.; COIMBRA, M. A. NMR structural elucidation of the arabinan from *Prunus dulcis* immunobiological active pectic polysaccharides **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 1, p. 27-33, 2006.

DOURADO, F.; MADUREIRA, P.; CARVALHO, V.; COELHO, R.; COIMBRA, M. A.; VILANOVA, M.; MOTA, M.; GAMA, F. M. Purification, structure and immunobiological activity of an arabinan-rich pectic polysaccharide from the cell walls of *Prunus dulcis* seeds. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 15, p. 2555-2566, 2004.

DUAN, X.; ZHANG, H.; ZHANG, D.; SHENG, J.; LIN, H.; JIANG, Y. Role of hydroxyl radical in modification of cell wall polysaccharides and aril breakdown during senescence of harvested longan fruit. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 203-207, 2011.

FARAJIAN, P.; KATSAGANI, M.; ZAMPELAS, A. Short-term effects of a snack including dried prunes on energy intake and satiety in normal-weight individuals. **Eating Behaviors**, v. 11, n. 3, p. 201-3, 2010.

FDA. **Food labeling - reference daily intakes and daily reference values**: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 58: 2206–2228 p. 1993.

FERMENIA, A.; GARCIA-CONESA, M.; SIMAL, S.; ROSSELÓ, C. Characterisation of the cell walls of loquat (*Eriobotrya japonica* L.) fruit tissues. **Carbohydrate Polymers**, v. 35, p. 169-177, 1998.

FILISETTI-COZZI, T. M.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, n. 1, p. 157-62, 1991.

FINCHER, G. B.; STONE, B. A.; CLARKE, A. E. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 34, p. 47-70, 1983.

FISSORE, E.; PONCE, N.; STORTZ, C.; ROJAS, A.; GERSCHENSON, L. Characterisation of fiber obtained from pumpkin (*Cucumis moschata* Duch.) mesocarp through enzymatic treatment. **Food science and technology international**, v. 13, n. 2, p. 141-151, 2007.

FLEMSTROM, G. **Gastric and duodenal mucosal bicarbonate secretion**. New York: Raven Press, 1987.

FORSTNER, J. F.; FORSTNER, G. G. **Gastrointestinal mucus**. 3. New York: Raven 1994.

FRY, S. C.; YORK, W. S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; HAYASHI, T.; JOSELEAU, J. P.; KATO, Y.; LORENCES, E. P.; MACLACHLAN, G. A.; MCNEIL, M. An

unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. **Physiologia Plantarum**, v. 89, n. 1, p. 1-3, 1993.

FÜGEL, R.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. A novel approach to quality and authenticity control of fruit products using fractionation and characterisation of cell wall polysaccharides. **Food Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 141-150, 2004.

GEBHARDT, S. E.; CUTRUFELLI, R.; MATTHEWS, R. H. **Composition of Food: Fruits and Fruit Juices** USDA. Washington: US Department of Agriculture 1982.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 1994.

GILLE, S.; DE SOUZA, A.; XIONG, G. Y.; BENZ, M.; CHENG, K.; SCHULTINK, A.; RECA, I. B.; PAULY, M. *O*-Acetylation of arabidopsis hemicellulose xyloglucan requires AXY4 or AXY4L, proteins with a TBL and DUF231 domain. **Plant Cell**, v. 23, n. 11, p. 4041-4053, 2011.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydrate Research**, v. 128, n. 1, p. 119-132, 1984.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ¹³C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 1212-1223, 1975.

GOULAO, L. F.; OLIVEIRA, C. M. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 1, p. 4-25, 2008.

GRASDALEN, H.; EINAR BAKØY, O.; LARSEN, B. Determination of the degree of esterification and the distribution of methylated and free carboxyl groups in pectins by ¹H nmr spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 184, p. 183-191, 1988.

GROH, B.; BAUER, H.; TREUTTER, D. Chemotaxonomical investigations of *Prunus domestica* by isoenzyme markers and phenolic compounds. **Scientia horticulturae**, v. 58, n. 1, p. 41-55, 1994.

GROSS, K. C.; SAMS, C. E. Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. **Phytochemistry**, v. 23, n. 11, p. 2457-2461, 1984.

HABIBI, Y.; MAHROUZ, M.; MARAIS, M. F.; VIGNON, M. R. An arabinogalactan from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 6, p. 1201-5, 2004.

HANNUKSELA, T.; PENHOAT, C. H. D. NMR structural determination of dissolved *O*-acetylated galactoglucomannan isolated from spruce thermomechanical pulp. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 2, p. 301-312, 2004.

HANTUS, S.; PAULY, M.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P.; YORK, W. S. Structural characterization of novel L-galactose-containing oligosaccharide subunits of jojoba seed xyloglucans. **Carbohydrate Research**, v. 304, n. 1, p. 11-20, 1997.

HARRIS, P. J.; STONE, B. A. **Chemistry and molecular organization of plant cell walls**. Blackwell: Oxford, 2008.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annual review of plant biology**, v. 40, n. 1, p. 139-168, 1989.

HE, L.; YIN, N.; CHENG, J. W.; WU, X. Q.; JIANG, J. X.; SONG, X. L. Structural features of a new heteropolysaccharide from the fruit bodies of *Melia azedarach* and its effect on cytotoxic activity. **Fitoterapia**, v. 80, n. 7, p. 399-403, 2009.

HEGDE, S.; MANESS, N. O. Sugar composition of pectin and hemicellulose extracts of peach fruit during softening over two harvest seasons. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 121, n. 6, p. 1162-1167, 1996.

HEGDE, S.; MANESS, N. O. Changes in apparent molecular mass of pectin and hemicellulose extracts during peach softening. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 123, n. 3, p. 445-456, 1998.

HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. **Journal of Biological Chemistry**, v. 180, n. 1, p. 249-261, 1949.

HILZ, H.; BAKX, E. J.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries—characterisation in berries, juice, and press cake. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, n. 4, p. 477-488, 2005.

HILZ, H.; DE JONG, L. E.; KABEL, M. A.; VERHOEF, R.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Bilberry xyloglucan - novel building blocks containing beta-xylose within a complex structure. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 2, p. 170-181, 2007.

HINZ, S. W.; VERHOEF, R.; SCHOLS, H. A.; VINCKEN, J. P.; VORAGEN, A. G. Type I arabinogalactan contains beta-D-Galp-(1→3)-beta-D-Galp structural elements. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 13, p. 2135-43, 2005.

HOFFMAN, M.; JIA, Z.; PEÑA, M. J.; CASH, M.; HARPER, A.; BLACKBURN, A. R.; DARVILL, A.; YORK, W. S. Structural analysis of xyloglucans in the primary cell walls of plants in the subclass *Asteridae*. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 11, p. 1826-1840, 2005.

HOGAN, D.; YAO, B.; STEINBACH, J.; ISENBERG, J. The enteric nervous system modulates mammalian duodenal mucosal bicarbonate secretion. **Gastroenterology**, v. 105, p. 410-410, 1993.

HOOSHMAND, S.; ARJMANDI, B. H. Viewpoint: dried plum, an emerging functional food that may effectively improve bone health. **Ageing Research Reviews**, v. 8, n. 2, p. 122-7, 2009.

HSIEH, Y. S. Y.; HARRIS, P. J. Xyloglucans of monocotyledons have diverse structures. **Molecular plant**, v. 2, n. 5, p. 943-965, 2009.

HSIEH, Y. S. Y.; HARRIS, P. J. Structures of xyloglucans in primary cell walls of gymnosperms, monilophytes (ferns sensu lato) and lycophytes. **Phytochemistry**, 2012.

HUBER, D. J.; KARAKURT, Y.; JEONG, J. Pectin degradation in ripening and wounded fruits. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 224-241, 2001.

HWANG, H. J.; KWON, M. J.; KIM, I. H.; NAM, T. J. The effect of polysaccharide extracted from the marine alga *Capsosiphon fulvescens* on ethanol administration. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2653-2657, 2008.

IACOMINI, M.; SERRATO, R. V.; SASSAKI, G. L.; LOPES, L.; BUCHI, D. F.; GORIN, P. A. Isolation and partial characterization of a pectic polysaccharide from the fruit pulp of *Spondias cytherea* and its effect on peritoneal macrophage activation. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7-8, p. 676-83, 2005.

IAGHER, F.; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S. Structural and rheological properties of polysaccharides from mango (*Mangifera indica* L.) pulp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, n. 1-3, p. 9-17, 2002.

ITO, S.; KATO, Y. A study of the structures of xyloglucans from the fruit cell walls of strawberry, persimmon, prune and banana. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 49, n. 4, p. 501-504, 2002.

JONES, J.; STOODLEY, R. Fractionation using copper complexes. **Methods in carbohydrate chemistry**, v. 5, p. 36-38, 1965.

JOYE, D.; LUZIO, G. Process for selective extraction of pectins from plant material by differential pH. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, n. 4, p. 337-342, 2000.

KANG, J.; CUI, S. W.; PHILLIPS, G. O.; CHEN, J.; GUO, Q. B.; WANG, Q. New studies on gum ghatti (*Anogeissus latifolia*) part II. Structure characterization of an arabinogalactan from the gum by 1D, 2D NMR spectroscopy and methylation analysis. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1991-1998, 2011.

KAYANO, S.; KIKUZAKI, H.; YAMADA, N. F.; AOKI, A.; KASAMATSU, K.; YAMASAKI, Y.; IKAMI, T.; SUZUKI, T.; MITANI, T.; NAKATANI, N. Antioxidant properties of prunes (*Prunus domestica* L.) and their constituents. **Biofactors**, v. 21, n. 1-4, p. 309-13, 2004.

KIEFER, L. L.; YORK, W. S.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Structure of plant-cell walls . Xyloglucan isolated from suspension-cultured sycamore cell-walls is *O*-acetylated. **Phytochemistry**, v. 28, n. 8, p. 2105-2107, 1989.

KIYOHARA, H.; HIRANO, M.; WEN, X. G.; MATSUMOTO, T.; SUN, X. B.; YAMADA, H. Characterisation of an anti-ulcer pectic polysaccharide from leaves of *Panax ginseng* CA Meyer. **Carbohydrate Research**, v. 263, n. 1, p. 89-101, 1994.

KOŠŤÁLOVÁ, Z.; HROMÁDKOVÁ, Z.; EBRINGEROVÁ, A. Structural diversity of pectins isolated from the Styrian oil-pumpkin (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) fruit. **Carbohydrate Polymers**, 2012.

KRATCHANOVA, M.; BENEMOU, C.; KRATCHANOV, C. On the pectic substances of mango fruits. **Carbohydrate Polymers**, v. 15, n. 3, p. 271-282, 1991.

KURZ, C.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Characterisation of cell wall polysaccharide profiles of apricots (*Prunus armeniaca* L.), peaches (*Prunus persica* L.), and pumpkins (*Cucurbita* sp.) for the evaluation of fruit product authenticity. **Food Chemistry**, v. 106, n. 1, p. 421-430, 2008.

LADANIYA, M. S. **Citrus fruit: biology, technology and evaluation**. New York: Academic Press, 2008.

LECAS, M.; BRILLOUET, J. M. Cell wall composition of grape berry skins. **Phytochemistry**, v. 35, n. 5, p. 1241-1243, 1994.

LEGENTIL, A.; GUICHARD, I.; PIFFAUT, B.; HALUK, J. P. Characterization of strawberry pectin extracted by chemical means. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 28, p. 569-576, 1995.

LEVIGNE, S.; RALET, M. C.; THIBAULT, J. F. Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 2, p. 145-153, 2002.

MANGANARIS, G. A.; VICENTE, A. R.; CRISOSTO, C. H.; LABAVITCH, J. M. Cell wall modifications in chilling-injured plum fruit (*Prunus salicina*). **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, n. 1, p. 77-83, 2008.

MARCELIN, O.; WILLIAMS, P.; BRILLOUET, J. M. Isolation and characterization of the two main cell-wall types from guava (*Psidium guajava* L) Pulp. **Carbohydrate Research**, v. 240, p. 233-243, 1993.

MC CREADY, R. **Extraction of the pectin from the citrus peels and preservation of pectin to pectic acid**: New York: Academic Press 1970.

MCNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, p. 625-663, 1984.

MELLINGER-SILVA, C.; SIMAS-TOSIN, F. F.; SCHIAVINI, D. N.; WERNER, M. F.; BAGGIO, C. H.; PEREIRA, I. T.; DA SILVA, L. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Isolation of a gastroprotective arabinoxylan from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10524-10528, 2011.

MIN, B.; LIM, J.; KO, S.; LEE, K. G.; LEE, S. H.; LEE, S. Environmentally friendly preparation of pectins from agricultural byproducts and their structural/rheological characterization. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 3855-3860, 2011.

MONDAL, S. K.; RAY, B.; THIBAULT, J. F.; GHOSAL, P. K. Cell-wall polysaccharides from the fruits of *Limonia acidissima*: isolation, purification and chemical investigation. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, n. 2, p. 209-212, 2002.

MOUTOUNET, M. Polyphenol oxidase of plum d'Ente: Changes in its activities during manufacture of prune d'Agen. **Annales Technologie Agricole**, v. 25, p. 343–356, 1976.

MURAMATSU, N.; TANAKA, K.; ASAKURA, T.; HAJI, T. Changes in cell wall polysaccharides and physical properties of peach (*Prunus persica* Batsch) fruit during ripening. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 73, n. 6, p. 534-540, 2004.

NASCIMENTO, A. M.; DE SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P.; MARIA-FERREIRA, D.; DA SILVA, L. M.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, 2012.

NERGARD, C. S.; DIALLO, D.; INNGJERDINGEN, K.; MICHAELSEN, T. E.; MATSUMOTO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; PAULSEN, B. S. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali: Antiulcer, radical scavenging and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2, p. 255-69, 2005.

NUNAN, K. J.; SIMS, I. M.; BACIC, A.; ROBINSON, S. P.; FINCHER, G. B. Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. **Plant Physiology**, v. 118, n. 3, p. 783-792, 1998.

NUNES, C.; SARAIVA, J. A.; COIMBRA, M. A. Effect of candying on cell wall polysaccharides of plums (*Prunus domestica* L.) and influence of cell wall enzymes. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 538-548, 2008.

ODONMAZIG, P.; BADGAA, D. An acidic o-xylan from the Siberian apricot (*Armeniaca siberica* L.) fruit. **Carbohydrate Research** v. 198, p. 163-167, 1990.

PEÑA, M. J.; DARVILL, A. G.; EBERHARD, S.; YORK, W. S.; O'NEILL, M. A. Moss and liverwort xyloglucans contain galacturonic acid and are structurally distinct from the xyloglucans synthesized by hornworts and vascular plants. **Glycobiology**, v. 18, n. 11, p. 891-904, 2008.

PEREZ, A.; POLLACK, S. **Fruit and Tree Nuts Outlook**. AGRICULTURE, U. S. D. O. Washington, DC: Economic Research Service 2012.

PETERSEN, B. O.; MEIER, S.; DUUS, J. O.; CLAUSEN, M. H. Structural characterization of homogalacturonan by NMR spectroscopy-assignment of reference compounds. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 16, p. 2830-3, 2008.

PRABASARI, I.; PETTOLINO, F.; LIAO, M. L.; BACIC, A. Pectic polysaccharides from mature orange (*Citrus sinensis*) fruit albedo cell walls: Sequential extraction and chemical characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 484-494, 2011.

RAMÍREZ-TRUQUE, C.; ESQUIVEL, P.; CARLE, R. Neutral sugar profile of cell wall polysaccharides of pitaya (*Hylocereus* sp.) fruits. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1134-1138, 2011.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REDGWELL, R. J.; MELTON, L. D.; BRASCH, D. J. Cell-wall polysaccharides of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*): Chemical features in different tissue zones of the fruit at harvest. **Carbohydrate Research**, v. 182, n. 2, p. 241-258, 1988.

REED-MANGELS, A.; HOLDEN, J. M.; BEECHER, G. R.; FORMAN, M. R.; LANZA, E. Carotenoid content of fruits and vegetables: An evaluation of analytical data. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 93, p. 284-296, 1993.

REID, J. S. G. **Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates**. Bristol: Academic Press, 1997.

RENARD, C. M.; THIBAULT, J. F.; MUTTER, M.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. Some preliminary results on the action of rhamnogalacturonase on rhamnogalacturonan oligosaccharides from beet pulp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 17, n. 6, p. 333-6, 1995.

RENARD, C. M. G. C.; GINIES, C. Comparison of the cell wall composition for flesh and skin from five different plums. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 1042-1049, 2009.

RENARD, C. M. G. C.; THIBAULT, J. F. Structure and properties of apple and sugar-beet pectins extracted by chelating agents. **Carbohydrate Research**, v. 244, n. 1, p. 99-114, 1993.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. A. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, n. 6, p. 929-967, 2001.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, n. 3, p. 433, 1979.

ROS, J. M.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Lemon albedo cell walls contain distinct populations of pectic hairy regions. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, n. 2, p. 159-166, 1998.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially *O*-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 4, p. 731-739, 2005.

SAULNIER, L.; BRILLOUET, J. M.; JOSELEAU, J. P. Structural studies of pectic substances from the pulp of grape berries. **Carbohydrate Research**, v. 182, n. 1, p. 63-78, 1988.

SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. **Complex pectins: structure elucidation using enzymes**. Amsterdam: Elsevier, 1996.

SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 8, p. 887-893, 2001.

SILVA, D. C.; FREITAS, A. L. P.; BARROS, F. C. N.; LINS, K. O. A. L.; ALVES, A. P. N. N.; ALENCAR, N. M. N.; DE FIGUEIREDO, I. S. T.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; FEITOSA, J. P. A.; MACIEL, J. S.; DE PAULA, R. C. M. Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 139-145, 2012.

SIMAS-TOSIN, F.; ABUD, A.; DE OLIVEIRA, C.; GORIN, P.; SASSAKI, G.; BUCCHI, D.; IACOMINI, M. Polysaccharides from peach pulp: Structure and effects on mouse peritoneal macrophages. **Food Chemistry**, 2012.

SMITH, B. G.; HARRIS, P. J. Polysaccharide composition of unignified cell-walls of pineapple [*Ananas comosus* (L) Merr] fruit. **Plant Physiology**, v. 107, n. 4, p. 1399-1409, 1995.

STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, M.; BOWEN, P. E.; HUSSAIN, E. A.; DAMAYANTI-WOOD, B. I.; FARNSWORTH, N. R. Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 41, n. 4, p. 251-86, 2011.

STEPHEN, A. M. **Other plant polysaccharides** New York: Academic Press, 1983.

SZABO, S. Mechanisms of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. **Scandinavian Journal of gastroenterology**, v. 22, n. S127, p. 21-28, 1987.

TAMAKI, Y.; KONISHI, T.; FUKUTA, M.; TAKO, M. Isolation and structural characterisation of pectin from endocarp of *Citrus depressa*. **Food Chemistry**, v. 107, p. 352-361, 2008.

TANAKA, L. Y. A.; DE OLIVEIRA, A. J. B.; GONÇALVES, J. E.; CIPRIANI, T. R.; DE SOUZA, L. M.; MARQUES, M. C. A.; DE PAULA WERNER, M. F.; BAGGIO, C. H.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. An arabinogalactan with anti-ulcer protective effects isolated from (*Cereus peruvianus*). **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 714-721, 2010.

TARNAWSKI, A.; HOLLANDER, D.; STACHURA, J.; KRAUSE, W. J.; ELTORAI, M.; DABROS, W.; GERGELY, H. Vascular and microvascular changes - key factors in the development of acetic acid-induced gastric ulcers in rats. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 12, p. S148, 1990.

TAYLOR, M.; RABE, E.; DODD, M.; JACOBS, G. Effect of storage regimes on pectolytic enzyme, pectic substances, internal conductivity and gel breakdown in cold stored songold plums. **Journal of Horticultural Science**, v. 69, n. 3, p. 527-534, 1994.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl group. **Biochemistry**, v. 11, n. 8, p. 1383-1388, 1972.

THOMAS, M.; THIBAUT, J. F. Cell-wall polysaccharides in the fruits of Japanese quince (*Chaenomeles japonica*): extraction and preliminary characterisation. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 3, p. 345-355, 2002.

THUDE, S.; CLASSEN, B. High molecular weight constituents from roots of *Echinacea pallida*: An arabinogalactan-protein and an arabinan. **Phytochemistry**, v. 66, n. 9, p. 1026-1032, 2005.

TIMELL, T. E. Wood Hemicelluloses Part I. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 19, p. 247-302, 1964.

TINKER, L. F.; DAVIS, P. A.; SCHNEEMAN, B. O. Prune fiber or pectin compared with cellulose lowers plasma and liver lipids in rats with diet-induced hyperlipidemia. **Journal of Nutrition**, v. 124, n. 1, p. 31-40, 1994.

TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of gum arabic: aids for structural assignments in the polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, n. 2, p. 151-158, 2002.

TISCHER, C. A.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. Structure of the arabinogalactan from gum tragacanth (*Astragalus gummifer*). **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 18, p. 1647-55, 2002.

VIDAL, S.; WILLIAMS, P.; O'NEILL, M. A.; PELLERIN, P. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, p. 315-323, 2001.

VIERHUIS, E.; YORK, W.; KOLLI, V.; VINCKEN, J.; SCHOLS, H.; VAN ALEBEEK, G.; VORAGEN, A. Structural analyses of two arabinose containing oligosaccharides derived from olive fruit xyloglucan: XXSG and XLSG. **Carbohydrate Research**, v. 3, n. 332, p. 285-97, 2001.

VINCKEN, J. P.; SCHOLS, H. A.; OOMEN, R. J. F. J.; MCCANN, M. C.; ULVSKOV, P.; VORAGEN, A. G. J.; VISSER, R. G. F. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. **Plant Physiology**, v. 132, n. 4, p. 1781-1789, 2003.

VORAGEN, A. G. J.; PILNIK, W.; THIBEAULT, J.-F.; AXELOS, M. A. V.; RENARD, C. M. G. C. Pectins. In: STEPHEN, A. M. (Ed.). **Food polysaccharides and their applications**. New York:: Marcel Dekker, 1995. p.287-340.

VRIESMANN, L. C.; PETKOWICZ, C. L. O. Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): Structural characterization of a pectic fraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 1, p. 72-79, 2009.

VRIESMANN, L. C.; TEÓFILO, R. F.; PETKOWICZ, C. L. O. Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 4, p. 1230-1236, 2011.

WALLACE, J. L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **The American journal of medicine**, v. 110, n. 1, p. S19-S23, 2001.

WANG, X. S.; DONG, Q.; ZUO, J. P.; FANG, J. N. Structure and potential immunological activity of a pectin from *Centella asiatica* (L.) Urban. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 22, p. 2393-2402, 2003.

WANG, X. S.; ZHENG, Y.; ZUO, J. P.; FANG, J. N. Structural features of an immunoactive acidic arabinogalactan from *Centella asiatica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, n. 3, p. 281-288, 2005.

WEI, W.; ZHOU, W.; ZANG, N.; JIANG, L. Structural analysis of a polysaccharide from *Fructus Mori Albae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 341-344, 2007.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 3, p. 97-104, 2006.

WOLFROM, M.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in carbohydrate chemistry**, v. 2, n. 2, p. 211-215, 1963a.

WOLFROM, M.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in carbohydrate chemistry**, v. 2, n. 1, p. 65-67, 1963b.

WU, X. M.; GAO, X. M.; TSIM, K. W.; TU, P. F. An arabinogalactan isolated from the stems of *Cistanche deserticola* induces the proliferation of cultured lymphocytes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, n. 5, p. 278-82, 2005.

XU, Y.; DONG, Q.; QIU, H.; CONG, R.; DING, K. Structural characterization of an arabinogalactan from *Platycodon grandiflorum* roots and antiangiogenic activity of its sulfated derivative. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 10, p. 2558-2566, 2010.

YAMADA, H. Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, n. 4, p. 269-276, 1994.

YAMADA, H.; HIRANO, M.; KIYOHARA, H. Partial structure of an anti-ulcer pectic polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum* L. **Carbohydrate Research**, v. 219, p. 173-192, 1991.

YANG, Q.; HUANG, B.; LI, H.; ZHANG, C.; ZHANG, R.; HUANG, Y.; WANG, J. Gastroprotective activities of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* in rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2012.

YAPO, B. M. Pineapple and banana pectins comprise fewer homogalacturonan building blocks with a smaller degree of polymerization as compared with yellow passion fruit and lemon pectins: implication for gelling properties. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 4, p. 717-721, 2009.

YAPO, B. M. Pectic substances: from simple pectic polysaccharides to complex pectins - A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 373-385, 2011a.

YAPO, B. M. Rhamnogalacturonan-I: A structurally puzzling and functionally versatile polysaccharide from plant cell walls and mucilages. **Polymer Reviews**, v. 51, n. 4, p. 391-413, 2011b.

YAPO, B. M.; KOFFI, K. L. Yellow passion fruit rind a potential source of low-methoxyl pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2738-2744, 2006.

YAPO, B. M.; ROBERT, C.; ETIENNE, I.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1356-1364, 2007.

YASHODA, H. M.; PRABHA, T. N.; THARANATHAN, R. N. Mango ripening—chemical and structural characterization of pectic and hemicellulosic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1335-1342, 2005.

YE, Y.; SO, H.; LIU, E.; SHIN, V.; CHO, C. Effect of polysaccharides from *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing. **Life Sciences**, v. 72, n. 8, p. 925-932, 2003.

YORK, W. S.; KUMAR KOLLI, V.; ORLANDO, R.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G. The structures of arabinoxyloglucans produced by solanaceous plants. **Carbohydrate Research**, v. 285, p. 99-128, 1996.

YORK, W. S.; OATES, J. E.; VAN HALBEEK, H.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P.; TILLER, P. R.; DELL, A. Location of the *O*-acetyl substituents on a nonasaccharide repeating unit of sycamore extracellular xyloglucan. **Carbohydrate Research**, v. 173, n. 1, p. 113-132, 1988.

YUAN, Y.; PADOL, I. T.; HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 3, n. 2, p. 80-89, 2006.

ZHAO, Z.; LI, J.; WU, X.; DAI, H.; GAO, X.; LIU, M.; TU, P. Structures and immunological activities of two pectic polysaccharides from the fruits of *Ziziphus jujuba*. **Food Research International**, v. 39, n. 8, p. 917-923, 2006.